

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2002-527397
(P2002-527397A)

(43) 公表日 平成14年8月27日 (2002.8.27)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	メモコード* (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
31/4965		31/4965	4 C 0 8 6
A 6 1 P 31/18		A 6 1 P 31/18	
43/00	1 0 5	43/00	1 0 5
// C 0 7 D 241/32		C 0 7 D 241/32	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 67 頁)			

(21) 出願番号 特願2000-575514(P2000-575514)
(86) (22) 出願日 平成11年10月12日 (1999. 10. 12)
(85) 翻訳文提出日 平成13年4月12日 (2001. 4. 12)
(86) 国際出願番号 P C T / A U 9 9 / 0 0 8 7 2
(87) 国際公開番号 W O 0 0 / 2 1 5 3 8
(87) 国際公開日 平成12年4月20日 (2000. 4. 20)
(31) 優先権主張番号 P P 6 4 6 4
(32) 優先日 平成10年10月12日 (1998. 10. 12)
(33) 優先権主張国 オーストラリア (A U)

(71) 出願人 ジ・オーストラリアン・ナショナル・ユニ
バーシティ
オーストラリア国 オーストラリアン・キ
ャピタル・テリトリー 0200、アクトン
(72) 発明者 グレアム・コックス
オーストラリア2539ニュー・サウス・ウェ
ールズ州ボーリー・ポイント、バンドル・
ヒル・ロード66番
(72) 発明者 ゲイリー・エワート
オーストラリア2602オーストラリアン・キ
ャピタル・テリトリー、ハケット、フィリ
ップ・アベニュー189番
(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イオンチャネル機能活性の調節方法

(57) 【要約】

本発明は、一般的に、ウイルス機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法に関し、より詳しくは、V p uイオンチャネル機能活性をダウンレギュレートすることによって、ウイルス機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法に関する。一層より詳しくは、本発明は、V p uイオンチャネル媒介H I V複製を阻害することによって、H I V感染またはA I D Sを治療する方法を提供する。

【請求項１】 ＨＩＶの機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法であって、ＨＩＶは哺乳類宿主細胞を感染させており、該宿主細胞の膜イオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とする該方法。

【請求項3】 該H I V機能活性がH I V複製である請求項3記載の方法。

【請求項4】 該宿主細胞がマクロファージである請求項3記載の方法。

【請求項 5】 該宿主細胞が単球である請求項 3 記載の方法。

【請求項6】 該剤がアミロライド・アナログまたはその機能相当物である請求項1ないし5いずれか1記載の方法。

【請求項7】 該アミロライド・アナログがピラジン環またはその機能相当物の5位にてアミノ基の置換を含む請求項6記載の方法。

【請求項 8】 該アミロライド・アナログがHMAまたはその機能相当物である請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】 該HMAが構造：

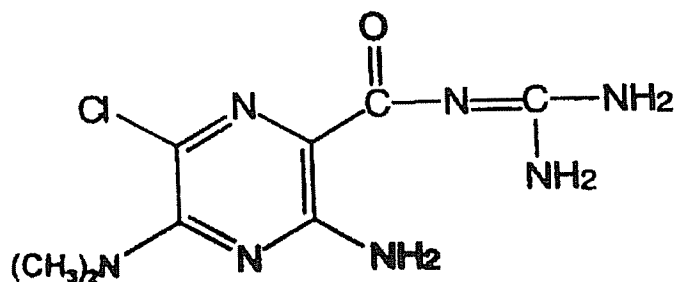
NC(=N)C(=O)c1nc(Cl)c(NCCCN)c1N

を含む請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】 該アミロライド・アナログがDMAまたはその機能相当物である請求項7記載の方法。

【請求項 1 1】 該DMAが構造：

【化2】



を含む請求項10記載の方法。

【請求項12】 哺乳類におけるHIV感染またはAIDSを治療および／または予防する方法であって、該方法は、HIV感染した哺乳類宿主細胞のVpuイオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とし、ここに、該Vpu機能活性が該HIVの機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する該方法

。

【請求項13】 該HIV機能活性がHIV複製である請求項12記載の方法。

【請求項14】 該宿主細胞がマクロファージである請求項13記載の方法

。

【請求項15】 該宿主細胞が単球である請求項14記載の方法。

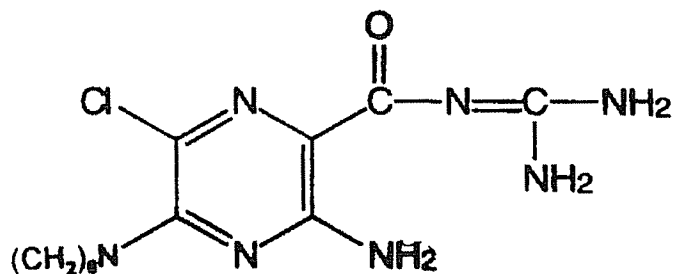
【請求項16】 該剤がアミロライド・アナログまたはその機能相当物である請求項12ないし15いずれか1記載の方法。

【請求項17】 該アミロライド・アナログがピラジン環またはその機能相当物の5位にてアミノ基の置換を含む請求項16記載の方法。

【請求項18】 該アミロライド・アナログがHMAまたはその機能相当物である請求項17記載の方法。

【請求項19】 該HMAが構造：

【化3】

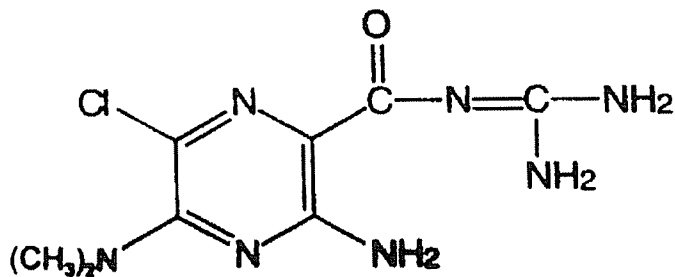


を含む請求項18記載の方法。

【請求項20】 該アミロライド・アナログがDMAまたはその機能相当物である請求項17記載の方法。

【請求項21】 該DNAが構造：

【化4】



を含む請求項20記載の方法。

【請求項22】 哺乳類におけるHIV感染および／またはAIDSの治療的および／または予防的処置用医薬の製造における剤の使用であって、該剤はHIV感染した細胞のVpuイオンチャネル機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する該使用。

【請求項23】 該機能活性がHIV複製の媒介である請求項22記載の使用。

【請求項24】 該剤がアミロライド・アナログまたはその機能相当物である請求項22または23記載の使用。

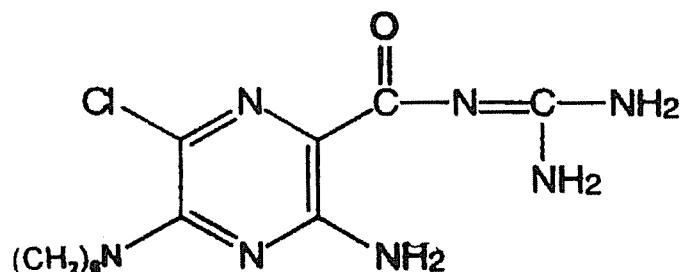
【請求項25】 該アミロライド・アナログがピラジン環またはその機能相当物の5位にてアミノ基の置換を含む請求項24記載の使用。

【請求項26】 該アミロライド・アナログがHMAまたはその機能相当物

である請求項25記載の使用。

【請求項27】 該HMAが構造：

【化5】

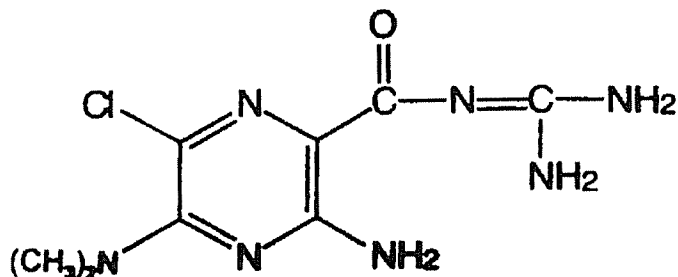


を含む請求項26記載の使用。

【請求項28】 該アミロライド・アナログがDMAまたはその機能相当物である請求項25記載の使用。

【請求項29】 該DMAが構造：

【化6】



を含む請求項28記載の使用。

【請求項30】 対象におけるV p uイオンチャネル機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法であって、V p uイオンチャネル機能活性を阻害するのに十分な時間および条件下、該対象に有効量のアミロライド・アナログまたはその機能相当物を投与することを特徴とする該方法。

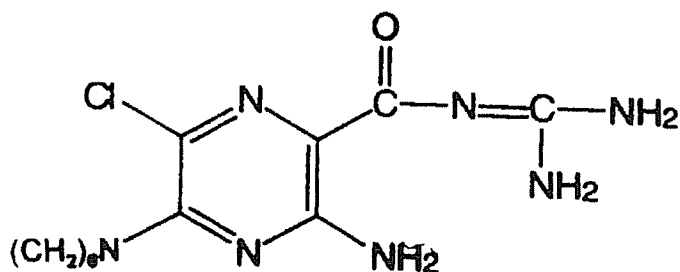
【請求項31】 該V p uイオンチャネル機能活性がH I V複製のV p uイオンチャネル機能活性である請求項30記載の方法。

【請求項32】 該アミロライド・アナログがピラジン環またはその機能相当物の5位にてアミノ基の置換を含む請求項30または31記載の方法。

【請求項33】 該アミロライド・アナログがHMAまたはその機能相当物である請求項32記載の方法。

【請求項34】 該HMAが構造：

【化7】

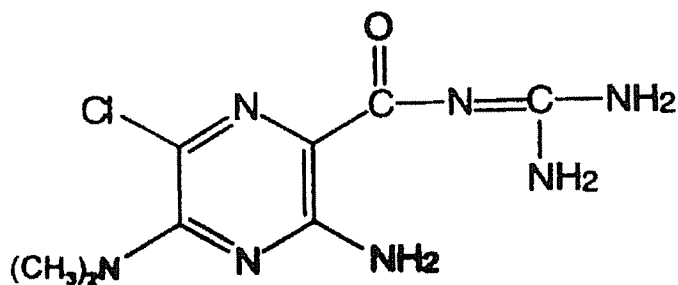


を含む請求項33記載の方法。

【請求項35】 該アミロライド・アナログがDMAまたはその機能相当物である請求項32記載の方法。

【請求項36】 該DMAが構造：

【化8】



を含む請求項35記載の方法。

【請求項37】 V p uイオンチャネル機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害するのに用いる剤。

【請求項38】 該V p uイオンチャネル機能活性がH I V複製の媒介である請求項37記載の剤。

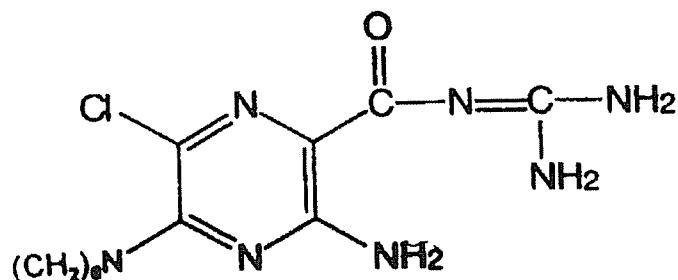
【請求項39】 該剤がアミロライド・アナログまたはその機能相当物である請求項38記載の剤。

【請求項40】 該アミロライド剤がHMAまたはその機能相当物である請

求項39記載の剤。

【請求項41】 該HMAが構造：

【化9】

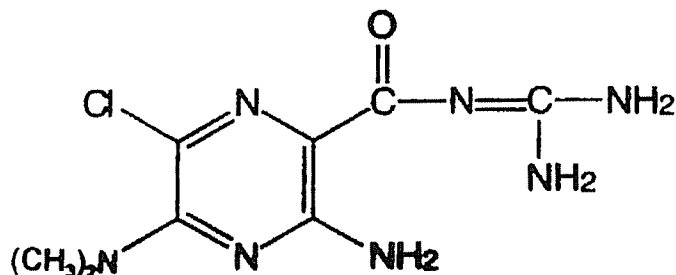


を含む請求項40記載の剤。

【請求項42】 該アミロライド・アナログがDMAまたはその機能相当物である請求項39記載の剤。

【請求項43】 該DMAが構造：

【化10】



を含む請求項42記載の剤。

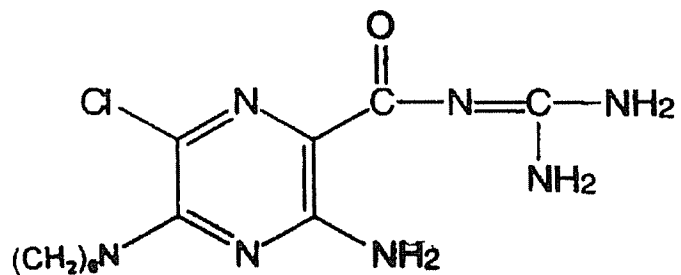
【請求項44】 Vpuイオンチャネル機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害するのに使用する医薬組成物であって、請求項1ないし21いずれか1記載の剤および1以上の医薬上許容される担体および／または希釈剤を含む該組成物。

【請求項45】 該剤がアミロライド・アナログまたはその機能相当物である請求項44記載の医薬組成物。

【請求項46】 該アミロライド・アナログがHMAまたはその機能相当物である請求項45記載の医薬組成物。

【請求項47】 該HMAが構造：

【化11】

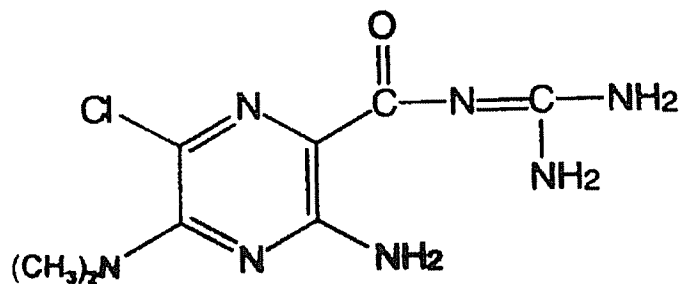


を含む請求項46記載の医薬組成物。

【請求項48】 該アミロライド・アナログがDMAまたはその機能相当物である請求項44記載の医薬組成物。

【請求項49】 該DMAが構造：

【化12】



を含む請求項48記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、一般に、ウイルス性機能活性を遅延させ、低下させ、さもなければ、阻害する方法に関し、より詳しくは、V p u イオンチャネル機能活性をダウンレギュレートすることによって、ウイルス性機能活性を遅延させ、低下させ、さもなければ、阻害する方法に関する。一層より詳しくは、本発明は、V p u イオンチャネル媒介H I V複製を阻害することによって、H I V感染またはA I D Sを治療する方法を提供する。

【0002】

【発明の背景】

この明細書中で引用されたアルファベット順の刊行物の参考文献の詳細を説明の終わりにまとめた。

【0003】

現在、H I V感染に対して完全に有効な単一の治療方法はない。H I V複製の多数の異なる局面を標的する薬物を用いた複合治療はA I D S症状を改善し、余命を延長化するのに最も有効な方法であることが証明されている [Barry, et al., 1998; Deeks, 1998; Miles, 1997; Miles, 1998; Moyle et al., 1998; Rachlis and Zarowny, 1998; Vell et al., 1997; Volberding and Deeks, 1998; および Volberdin, 1998]。例えば、成功した手段は、ウイルス性逆転写酵素およびタンパク質分解酵素を標的する薬物で達成された [Miller and Sarver, 1997; Mitsuya, 1992; Moore, 1997; および Thomas and Brady, 1997]。

【0004】

タンパク質V p uはH I Vによってコード化されるイオンチャネルを形成し、C D 4 ウイルス受容体分子の細胞表面発現のダウンレギュレーション、小胞体からのg p 1 6 0流出の制御および該細胞表面へのその運搬および該細胞表面膜からのビリオン出芽の調節を含むウイルス寿命サイクルにおいて、多数の知られた役割を有する。V p uの不存在下、H I V複製は、単球およびマクロファージにおいて激しく遅延されることが示されている [Balliet et al., 1994; Westerver

lt et al., 1992]。それにもかかわらず、V p uは、H I Vの「アクセサリー」タンパク質と名付けられている。何故ならば、生体外でのウイルス複製に関し、その知られた機能はいずれも重要ではなさそうだからである。

【0005】

H I V感染を治療し、予防する可能性を向上させるため、H I V寿命サイクルの様々な局面を阻害することが可能な分子を同定するという目下の必要がある。本発明につながる研究において、驚くべきことに、本発明者らは、現在の定説にも関わらず、ウイルス複製（および、特にH I V複製）は、V p uイオンチャネル機能を阻害するか、さもなければ、ダウンレギュレートすることによって、遅延させ得ると決定した。さらに、本発明者らは、薬物アミロライドはH I Vに対してなんら影響を有しないが、当該ピラジンの5位に位置するH₂ N基が置換されているアミロライド・アナログがV p u機能を阻害し、それにより、H I V寿命サイクルの継続を阻害することも決定した。

【0006】

【発明の概要】

本明細書および特許請求の範囲を通して、断りがなければ、「含む (comprise)」なる語、および「含む (comprises)」および「含んでいる (comprising)」のごとき変形は、言明された整数もしくはステップ、または整数もしくはステップの群を包含するが、その他のいかなる整数もしくはステップ、または整数もしくはステップの群の排除を意味しないものと理解される。

【0007】

本明細書は、プログラムP a t e n t I nバージョン2.0を用いて作成されたヌクレオチドおよびアミノ酸配列情報を含むし、本明細書の参考文献一覧の後に示す。各ヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、配列表において、数値表示<210>に続く配列認識番号（例えば、<210>1、<210>2など）によって認識される。各ヌクレオチドまたはアミノ酸配列につき、長さ、配列型（DNA、タンパク質（P R T）など）および起源生体は、それぞれ、数値表示フィールド<211>、<212>および<213>に共される情報により示される。本明細書中に引用されるヌクレオチドおよびアミノ配列は、数値表示フィールド

<400>に続く配列認識番号（例えば、<400>1、<400>2など）に共される情報により規定される。

【0008】

本発明の一つの局面は、ウイルスの機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、ここに、ウイルスは哺乳類宿主細胞を感染させており、該方法は、該宿主細胞の膜イオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とする。

【0009】

本発明のもう一つの局面は、より詳しくは、H I Vの機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、H I Vは哺乳類宿主細胞を感染させており、該方法は、該宿主細胞のV p uイオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とする。

【0010】

本発明のさらにもう一つの局面は、H I V複製を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、H I Vは哺乳類を感染させており、該方法は、該宿主細胞のV p uイオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とする。

【0011】

本発明のなおもう一つの局面は、H I Vの機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、H I Vは哺乳類マクロファージを感染させており、該方法は、該マクロファージのV p uイオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とする。

【0012】

本発明のさらになおもう一つの局面は、H I V複製を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、H I Vは哺乳類宿主細胞を感染させており、該方法は、V p uイオンチャネル機能活性を阻害するのに十分な時間および条

件下、該宿主細胞に有効量のアミロライド・アナログまたはその機能相当物を接触させることを特徴とする。

【0013】

本発明のさらなる局面は、H I V複製を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、H I Vは哺乳類宿主細胞を感染させており、該方法は、H I V複製のV p uイオンチャネル媒介を阻害するのに十分な時間および条件下、該宿主細胞に有効量のHMAまたはその機能相当物を接触させることを特徴とする。

【0014】

本発明のもう一つのさらなる局面は、H I V複製を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、H I Vは哺乳類宿主細胞を感染させており、該方法は、H I V複製のV p uイオンチャネル媒介を阻害するのに十分な時間および条件下、該宿主細胞に有効量のDMAまたはその機能相当物を接触させることを特徴とする。

【0015】

本発明のさらにもう一つのさらなる局面は、哺乳類におけるH I V感染またはA I D Sの治療および／または予防の方法を提供し、該方法は、H I V感染した哺乳類宿主細胞のV p uイオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とし、ここに、該V p u機能活性ダウンレギュレーションは、該H I Vの機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する。

【0016】

本発明のさらになおもう一つのさらなる局面は、哺乳類におけるH I V感染またはA I D Sの治療および／または予防の方法を提供し、該方法は、H I V感染した哺乳類宿主細胞のV p uイオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とし、ここに、該V p u機能活性ダウンレギュレーションは、H I V複製を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する。

【0017】

本発明の別の局面は、対象における膜イオンチャネル機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、該方法は、膜イオンチャネル機能活性を阻害するのに十分な時間および条件下、該対象に有効量のアミロライド・アナログまたはその機能相当物を投与することを特徴とする。

【0018】

本発明のなお別の局面は、哺乳類におけるV p uイオンチャネル機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、該方法は、V p uイオンチャネル機能活性を阻害するのに十分な時間および条件下、該対象に有効量のアミロライド・アナログまたはその機能相当物を投与することを特徴とする。

【0019】

本発明のさらに別の局面は、哺乳類におけるH I V複製のV p uイオンチャネル媒介を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、V p uイオンチャネル機能活性を阻害するのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量のアミロライド・アナログまたはその機能相当物を投与することを特徴とする。

【0020】

本発明のさらになお別の局面は、上に定義したV p uイオンチャネル機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害するのに有用な剤を提供する。

【0021】

本発明のさらにもう一つの局面は、V p uイオンチャネル機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害するのに用いられ、上に定義した剤および1以上の医薬上許容される担体および／または希釈剤を含む組成物を提供する。

【0022】

【発明の実施の形態】

本発明は、宿主細胞がV p uイオンチャネルを発現させるウイルス、特にH I Vの複製をこのイオンチャネルの機能を阻害することによって遅延させ得るといふ驚くべき確認に、部分的に根拠を置く。さらに、アミロライドはH I V複製に何ら影響を有しないが、アミロライド・アナログは、V p uイオンチャネル機能を阻害することによって、H I V寿命サイクルを阻害できる。今や、この確認は

、限定しないが、アミロライド・アナログのごとき剤をウイルス性症状の治療および予防用の抗菌剤として使用することを許容する。

【0023】

従って、本発明の一つの局面は、ウイルスの機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、ウイルスは哺乳類宿主細胞を感染させており、該方法は、該宿主細胞の膜イオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とする。

【0024】

「膜イオンチャネル」への言及は、膜を横切ってイオンを輸送する構造への言及と理解すべきである。本発明はイオンチャネルにまで及び、それらは受動的、浸透圧、能動的または交換輸送のごとき手段により機能するであろう。該イオンチャネルは、細胞内または細胞外手段により形成されるであろう。例えば、該イオンチャネルは、細胞によって、その機能を容易にするために天然に形成されるイオンチャネルであろう。あるいは、該イオンチャネルは、細胞外手段により形成されるであろう。細胞外手段は、例えば、導入された化学薬品、薬物またはイオノフォアのごとき他の剤によるか、あるいは、細胞に侵入したウイルスによりコード化されるウイルス性タンパク質の機能活性によるイオンチャネルの形成を含む。好ましくは、本発明のイオンチャネルは、H I Vでの細胞の感染に起因するイオンチャネルであって、より詳しくは、該イオンチャネルはH I Vタンパク質V p uにより形成される（以下「V p uイオンチャネル」という）。

【0025】

本発明の対象であるイオンチャネルは膜を横切るイオンの輸送を容易にする。該膜はいずれの膜であってよく、外細胞壁形質膜に限定されない。従って、「膜」は、ゴルジ体および小胞体のごとき、いずれの細胞器官を取り巻く膜、外細胞膜、該細胞内部に位置するいずれの外来抗原を取り巻く膜（例えば、ウイルスエンベロープ）または細胞外に位置する外来生体の膜を包含する。膜は、典型的に、必ずではないが、流動的な脂質二重層からなる。該対象イオンチャネルはいずれの構造であってもよい。例えば、V p uイオンチャネルは、H I V-1により

コード化され、例えば、感染した細胞のゴルジ体または小胞体に関連する内在性膜タンパク質であるV p uにより形成される。以下、「V p uイオンチャネル」への言及は、全ての他のイオンチャネルを含むものと読み替えられるべきである。

【0026】

従って、本発明は、より詳しくは、H I Vの機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、H I Vは哺乳類宿主細胞を感染させており、該方法は、該宿主細胞のV p uイオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とする。

【0027】

「H I V」への言及は、いずれのH I V株への言及として、およびホモログおよび突然変異体を含むものと理解すべきである。

【0028】

本発明を決して限定することなく、V p uはN-末端膜貫通アンカーおよび親水性細胞質C-末端ドメインを持つ約80個のアミノ酸を含むタンパク質である。該C-末端ドメインは、典型的には、12個のアミノ酸配列を含み、それは保存され、リン酸化された2つのセリン残基を含有する [Schubert et al., 1994 および Friborg et al., 1995]。V p uはH I V-1によりコード化される膜内在性タンパク質である。それは、感染した細胞中のゴルジおよび小胞体膜に関連するが、人工的に過剰発現させたとき [Schubert et al., 1996a] 以外は、ウイルスエンベロープ中にも形質膜中にも検出されていない。本発明を決して限定することなく、V p uはホモオリゴマーを形成する能力を有するが、その天然複合体中のサブユニットの正確な数は分かっていない。V p uの細胞質ドメインの二次構造および三次折畳みは、NMRおよびCD分光分析ならびに分子運動計算を組合せることにより決定され [Willbold et al., 1997]、該リン酸化されたセリン残基を含有する短い柔軟なループにより隔たれた2つの α -ヘリックスが明かにされている。該膜貫通ドメインの最近の構造データ [Wray et al., 1999] は、該領域は α -ヘリックスであるという理論予測を裏付け、二重層垂線に

対して30°未満の傾き角であることを示す。2つの分子運動シミュレーション研究が、オリゴマー形成は該膜に広がる α -ヘリックスの束を生じるという仮定に基づき、報告されている[Grice et al., 1997; および Moore et al., 1998]。両方の研究とも5量体複合体の形成を裏付ける。しかしながら、異なる初期条件および束縛パラメータを用いることにより、該複合体中の個々のヘリックスの配向について、異なる結論に達する。かくして、天然Vpu複合体の実際の構造は決定すべきものとどまっている。

【0029】

本発明者らによりVpuはイオンチャネルを形成することが示されたという事実にもかかわらず、本発明の出現以前は、Vpuによるイオンチャネル形成はHIVウイルスの寿命サイクルにとって重大な機能であることは知られていなかった。

【0030】

イオンチャネルの「機能活性」への言及は、イオンチャネルが行うか、または関わるいずれの1以上の機能への言及として理解すべきである。例えば、Vpuタンパク質コード化イオンチャネルは、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- および PO_4^{3-} の輸送を容易にすることに加えて、小胞体中のCD4分子の崩壊においても役割を演じる。該Vpuタンパク質コード化イオンチャネルは、該HIV寿命サイクルを媒介することにおいても役割を演じるものと考えられている。なぜならば、このチャネルを不活性化すると、HIV寿命サイクル、特に、HIVの複製が阻害されるからである。しかしながら、本発明は、該HIV寿命サイクルおよび、特に、HIV複製を阻害するメカニズムによりHIV感染を処置することには限定されない。むしろ、本発明はVpuイオンチャネル機能活性作用を阻害して、HIV生存率または機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害するいずれのメカニズムをも包含するものと理解されるべきである。好ましくは、該機能活性はHIVの複製の媒介である。これに関し、ウイルスの「機能活性」への言及は、ウイルスが行うか、または関わるいずれの1以上の機能への言及として理解されるべきである。これは、例えば、ウイルス複製および出芽を含む。好ましくは、該機能活性はHIV複製である。

【0031】

「H I V複製」への言及は、H I Vビリオンの構築または放出を阻害することのごとき、H I V寿命サイクルのいずれの1以上の段階または局面をも含むものと理解されるべきである。H I V複製の該V p u媒介は直接的または間接的手段によるものであろう。該V p uイオンチャネルが、いずれかの1以上のその寿命サイクル段階にてH I Vと直接相互作用するならば、該V p u媒介は直接的である。それがH I V以外の分子に作用し、他の分子が該H I V寿命サイクルのいずれの1以上の局面または段階を直接的または間接的のいずれかで調節するならば、該V p u媒介は間接的である。従って、本発明の方法は、H I V寿命サイクルのいずれの1以上の局面または段階の媒介に結びつくステップのカスケードの導入によるH I V複製の媒介を包含する。

【0032】

この好ましい具体例によれば、本発明は、H I V複製を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、H I Vは哺乳類宿主細胞を感染させており、該方法は、該宿主細胞のV p uイオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とする。

【0033】

イオンチャネル機能活性および、特に、H I V複製のV p u媒介を「ダウンレギュレートする」への言及は、直接的および間接的の両方のメカニズムによる該活性のいずれかの1以上の局面の部分的または完全阻害への言及として理解されるべきである。例えば、適当な剤は、V p uイオンチャネルと直接的に相互作用して、H I V複製を妨げるであろうし、あるいは、適当な剤は間接的に作用して、例えば、該V p uイオンチャネル以外の分子と相互作用することによって該複製を妨げるであろう。ここに、当該他の分子は該V p uイオンチャネルと相互作用し、阻害する。

【0034】

イオンチャネル機能活性の阻害は、当業者によく知られているであろういずれの適当な方法によって達成することができ、それは、該対象のイオンチャネルの

機能をブロックするか、さもなければ、ダウンレギュレートすることができるタンパク質性または非タンパク質性分子をウイルス感染した細胞に接触させることを含む。V p uイオンチャネル活性をブロックする分子についてのスクリーニングは、例えば、実施例11に開示した方法を含むいずれの適当な方法によって達成することができる。イオンチャネル機能活性のダウンレギュレーションは、該対象の宿主細胞のごとき細胞を、該対象のイオンチャネルの機能をブロックするか、さもなければ、ダウンレギュレートすることができる分子を発現する核酸分子でトランスフェクトすることによって達成することができることも理解されるべきである。従って、「剤」への言及は、いずれのタンパク質性または非タンパク質性分子への言及として理解されるべきであって、それは直接的または間接的にV p uイオンチャネル機能活性を阻害する核酸分子を含む。「剤」への言及は、該剤の機能相当物および誘導体への言及を含むと理解されるべきである。

【0035】

H I Vに感染した「哺乳類宿主細胞」への言及は、H I Vに感染しているいずれの細胞への言及として理解されるべきである。これは、例えば、感染したC D 4⁺細胞または感染した単球もしくはマクロファージを含む。本発明を決して限定することなく、H I V-1がマクロファージ中で感染させ、効率的に複製する能力はA I D S発生病理の本質であると考えられる。実際、マクロファージ指向性H I V単離体が、A I D S進行のために必要かつ充分であろう。従って、好ましい具体例において、対象のH I V感染した細胞はH I V感染したマクロファージもしくは単球である。

【0036】

この好ましい具体例によれば、H I Vの機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法が提供され、H I Vは哺乳類マクロファージを感染させており、該方法は、該マクロファージのV p uイオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とする。

【0037】

もう一つの好ましい具体例において、H I Vの機能活性を低下させ、遅延させ

、さもなければ、阻害する方法が提供され、H I Vは哺乳類マクロファージを感染させており、該方法は、該単球のV p uイオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とする。

【0038】

関連する局面において、本発明者らは、驚くべきことに、アミロライドのアナログがV p uイオンチャネル機能活性を阻害することも決定した。これは、V p uイオンチャネルに対して一見したところ不適合な該対象アナログの構造による予期せぬ結果である。特に、本発明をいずれかの1の理論または作用の態様に限定することなく、アミロライド・アナログは、V p uイオンチャネルがブロックされるようにすることによって、細胞からのH I Vビリオン放出を阻害すると考えられている。このブロッキングは置換されたアミロライドによって影響をうけるが、置換されていないアミロライドによっては影響されない。置換されていないアミロライドは、ピラジン環の3-および5-位にアミノ基、および6-位にクロロ基を持つピラジノイルグアニジンである。しかしながら、本発明は、この形態のアミロライドのアナログまたはその機能相当物に限定されるものと理解されるべきではない。本発明は、いずれの形態のアミロライドのアナログ、例えば、アミロライドの他の異性体をも包含する。従って、「アミロライド・アナログ」への言及は、例えば、いずれかの位置にて、しかし、より詳しくは、該ピラジン環の6つの位置のいずれかの1以上にての原子または分子の付加、欠失または置換、あるいは、原子または分子の電荷の変化のごとき、付加、欠失または置換を示すいずれのアミロライド分子への言及として理解すべきである。好ましくは、該アミロライド・アナログは、該ピラジン環の5-位にてアミノ基の置換を示すアミロライド分子である。

【0039】

従って、好ましい具体例において、本発明は、H I V複製を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、H I Vは哺乳類宿主細胞を感染させており、該方法は、V p uイオンチャネル機能活性を阻害するのに十分な時間および条件下、該宿主細胞に有効量のアミロライド・アナログまたはその機能相当

物を投与することを特徴とする。

【0040】

好ましくは、該アミロライド・アナログは該ピラジン環またはその機能相当物の5一位にてアミノ基の置換を含む。一層より好ましくは、該V p uイオンチャネル機能活性は、H I V複製のV p uイオンチャネル媒介である。

【0041】

さらにより好ましくは、該アミロライド・アナログは5－(N,N－ヘキサメチレン)－アミロライド(本明細書中「HMA」という)または5－(N,N－ジメチル)－アミロライド(本明細書中「DMA」という)である。

【0042】

この好ましい具体例において、H I V複製を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法が提供され、H I Vは哺乳類宿主細胞を感染させており、該方法は、H I V複製のV p uイオンチャネル媒介を阻害するのに十分な時間および条件下、該宿主細胞に有効量のHMAまたはその機能相当物を接触させることを特徴とする。

【0043】

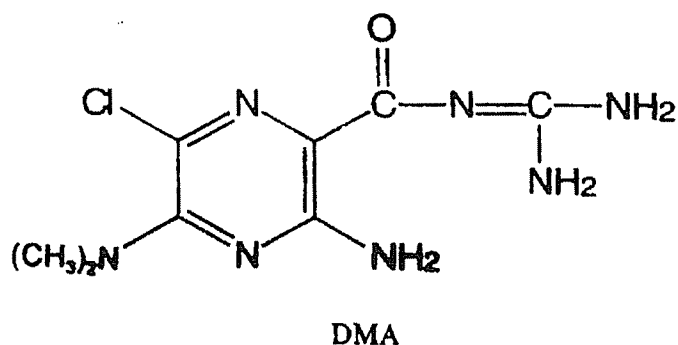
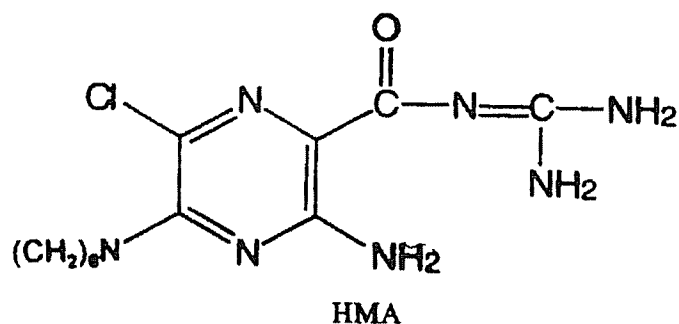
もう一つの好ましい具体例において、H I V複製を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法が提供され、H I Vは哺乳類宿主細胞を感染させており、該方法は、H I V複製のV p uイオンチャネル媒介を阻害するのに十分な時間および条件下、該宿主細胞に有効量のDMAまたはその機能相当物を接触させることを特徴とする。

【0044】

最も好ましくは、該アミロライド・アナログは、構造：

【0045】

【化13】



【0046】

を含む。

【0047】

アミロライド・アナログの「機能相当物」および（上記したごとく、該V p u イオンチャネル機能活性が阻害されるか、さもなければ、ダウンレギュレートされる程度に）該アミロライド・アナログと同等な機能活性を示すいずれの他のタンパク質性または非タンパク質性剤は、融合タンパク質を含む天然、合成または組換え体起源からの機能的に活性な誘導体、断片、部品、部分および化学的相当物を含む。化学的相当物は必ずしも該対象の剤からは誘導されないであろうが、ある種のコンホメーション類似性を共有するであろう。あるいは、化学的相当物は、特別にデザインされて、該剤のある種の物理化学的特性を真似ることができる。化学的相当物は化学的に合成されるか、または、例えば、天然産物スクリーニングの後に検出することができる。機能相当物は拮抗性または作動性特性も有し、そのような分子の使用が本発明により意図される。

【0048】

該剤またはその機能相当物がタンパク質性分子である場合、本発明は該タンパク質性分子の機能誘導体にまで及ぶものと理解されるべきである。誘導体は、融合タンパク質を含む天然、合成または組換え体起源からの断片、部品、部分、突然変異体、および模擬体を含む。誘導体はアミノ酸の挿入、欠失または置換から誘導することができる。アミノ酸挿入誘導体は、アミノおよび／またはカルボキシル末端融合ならびに単一または複数のアミノ酸の配列内挿入を含む。挿入アミノ酸配列変異体は、1以上のアミノ残基が該タンパク質の所定のサイトに導入されるものであるが、得られた産物の適当なスクリーニングにより、無秩序挿入も可能である。欠失変異体は、該配列からの1以上のアミノ酸の除去を特徴とする。置換アミノ酸変異体は、該配列中の少なくとも1つの残基が除去され、異なる残基がその場所に挿入されたものである。置換アミノ酸変異体の例は、保存アミノ酸置換体である。保存アミノ酸置換体は、典型的に、以下のグループ内での置換を含む：グリシンおよびアラニン；バリン、イソロイシンおよびロイシン；アスパラギン酸およびグルタミン酸；アスパラギンおよびグルタミン；セリンおよびトレオニン；リジンおよびアルギニン；および、フェニルアラニンおよびチロシン。アミノ酸配列への付加は、他のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質との融合を含む。

【0049】

本明細書で意図されるタンパク質のホモログは、限定されないが、様々な種から誘導されたタンパク質を含む。

【0050】

該誘導体は、ペプチド、ポリペプチドまたは他のタンパク質性もしくは非タンパク質性分子に融合した全タンパク質の部品の特定のエピトープを有する断片を含む。例えば、タンパク質（または非タンパク質性分子）またはその誘導体を分子に融合させて、細胞中へのその侵入を容易にすることができる。

【0051】

「誘導体」への言及は、アナログへの言及も含むと理解されるべきである。本明細書で意図されるアナログは、限定されないが、側鎖の修飾、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質合成中での異常アミノ酸および／またはその誘導体の

組込み、および、クロスリンカーおよび該タンパク質性分子またはそれらのアナログにコンホメーション束縛を課す他の方法の使用を含む。

【0052】

本発明によって意図される側鎖修飾の例は、アルデヒドとの反応後 NaBH_4 での還元による還元性アルキル化によるごときアミノ基の修飾；メチルアセトイミダートでのアミジン化 (amidination)；無水酢酸でのアシル化；シアナートでのアミノ基のカルバモイル化；2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) でのアミノ基のトリニトロベンジル化；無水コハク酸および無水テトラヒドロフタル酸でのアミノ基のアシル化；および、ピリドキサル-5-ホスファートに引続く NaBH_4 での還元によるリジンのピリドキシル化を含む。

【0053】

アルギニン残基のグアニジン基は、2,3-ブタジオン、フェニルグリオキサールおよびグリオキサールのごとき試薬でのヘテロ環縮合生成物の形成により修飾することができる。

【0054】

該カルボキシル基は、O-アシルイソ尿素形成によるカルボジイミド活性化に引続き、例えば、対応するアミドへの次なる誘導化によって修飾することができる。

【0055】

スルフィドリル基は、ヨード酢酸またはヨードアセトアミドでのカルボキシメチル化；システイン酸への過ギ酸酸化；他のチオール化合物での混合ジスルフィドの形成；マレイミド、無水マレイン酸または他の置換マレイミドとの反応；4-クロロメルクリベンゾアート、4-クロロメルクリフェニルスルホン酸、塩化フェニル水銀、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノールまたは他の水銀剤を用いる水銀剤誘導体の形成；アルカリ pH にてのシアナートでのカルバモイル化のごとき方法によって修飾することができる。

【0056】

トリプトファン残基は、例えば、N-ブロモスクシンイミドでの酸化または臭化2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルもしくはハロゲン化スルフェニルでのイ

インドール環のアルキル化によって修飾することができる。一方、チロシン残基は、テトラニトロメタンでニトロ化して3-ニトロチロシン誘導体を形成することによって変化させることができる。

【0057】

ヒスチジン残基のイミダゾール環の修飾は、ヨード酢酸誘導体でのアルキル化またはN-ジエチルピロカーボナートでのN-カルボエトキシ化により達成することができる。

【0058】

タンパク質合成中に異常アミノ酸またはその誘導体を組み込むことの例は、限定されないが、ノルロイシン、4-アミノブチル酸、4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸、6-アミノヘキサン酸、t-ブチルグリシン、ノルバリン、フェニルグリシン、オルニチン、サルコシン、4-アミノ-3-ヒドロキシ-6-メチルヘプタン酸、2-チエニルアラニンおよび／またはアミノ酸のD-異性体の使用を含む。本明細書で意図される異常アミノ酸をテーブル1に示す。

【0059】

【表1】

テーブル1

非標準アミノ酸	コード	非標準アミノ酸	コード
α -アミノブチル酸	Abu	L-N-メチルアラニン	Nmala
α -アミノ- α -メチルブチラート	Mgab	L-N-メチルアルギニン	Nmarg
アミノシクロプロパン=カルボキシラート	Cpro	L-N-メチルアスパラギン	Nmasn
		L-N-メチルアスパラギン酸	Nmasp
アミノイソブチル酸	Aib	L-N-メチルシステイン	Nmcys
アミノノルボルニル=カルボキシラート	Norb	L-N-メチルグルタミン	Nmgln
		L-N-メチルグルタミン酸	Nmglu
シクロヘキシルアラニン	Chexa	L-N-メチルヒスチジン	Nmhis
シクロペンチルアラニン	Cpen	L-N-メチルイソロイシン	Nmile
D-アラニン	Dal	L-N-メチルロイシン	Nmleu
D-アルギニン	Darg	L-N-メチルリジン	Nmlys
D-アスパラギン酸	Das	L-N-メチルメチオニン	Nmnet
D-システイン	Dcys	L-N-メチルノルロイシン	Nmnle
D-グルタミン	Dgln	L-N-メチルノルバリン	Nmnva
D-グルタミン酸	Dglu	L-N-メチルオルニチン	Nmorn
D-ヒスチジン	Dhis	L-N-メチルフェニルアラニン	Nmphe
D-イソロイシン	Dile	L-N-メチルプロリン	Nmpro
D-ロイシン	Dleu	L-N-メチルセリン	Nmser
D-リジン	Dlys	L-N-メチルトレオニン	Nmthr
D-メチオニン	Dmet	L-N-メチルトリプトファン	Nmtrp
D-オルニチン	Dorn	L-N-メチルチロシン	Nmtyr
D-フェニルアラニン	Dphe	L-N-メチルバリン	Nmval
D-プロリン	Dpro	L-N-メチルエチルグリシン	Nmetg
D-セリン	Dser	L-N-メチル-t-ブチルグリシン	Nmtbug
D-トレオニン	Dthr	L-ノルロイシン	Nle

【表2】

D-トリプトファン	Dtrp	L-ノルバリン	Nva
D-チロシン	Dtyr	α -メチル-アミノブチラート	Maib
D-バリン	Dval	α -メチル- γ -アミノブチラート	Mgabv
D- α -メチルアラニン	Dmala	α -メチルシクロヘキシルアラニン	Mchexa
D- α -メチルアルギニン	Dmarg	α -メチルシクロペンチルアラニン	Mcpen
D- α -メチルアスパラギン	Dmasn	α -メチル- α -ナフチルアラニン	Manap
D- α -メチルアスパルタート	Dmasp	α -メチルベニシルアミン	Mpen
D- α -メチルシステイン	Dmcys	N-(4-アミノブチル)グリシン	Nglu
D- α -メチルグルタミン	Dmgln	N-(2-アミノエチル)グリシン	Naeg
D- α -メチルヒスチジン	Dmhis	N-(3-アミノプロピル)グリシン	Norn
D- α -メチルイソロイシン	Dmile	N-アミノ- α -メチルブチラート	Nmaab
D- α -メチルロイシン	Dmleu	α -ナフチルアラニン	Anap
D- α -メチルリジン	Dmlys	N-ベンジルグリシン	Nphe
D- α -メチルメチオニン	Dmmet	N-(2-カルバミルエチル)グリシン	Ngln
D- α -メチルオルニチン	Dmorn	N-(カルバミルメチル)グリシン	Nasn
D- α -メチルフェニルアラニン	Dmphe	N-(2-カルボキシエチル)グリシン	Nglu
D- α -メチルプロリン	Dmpro	N-(カルボキシメチル)グリシン	Nasp
D- α -メチルセリン	Dmser	N-シクロブチルグリシン	Ncbut
D- α -メチルトレオニン	Dmthr	N-シクロヘプチルグリシン	Nchep
D- α -メチルトリプトファン	Dmtrp	N-シクロヘキシルグリシン	Nchex
D- α -メチルチロシン	Dmtty	N-シクロデシルグリシン	Ncdec
D- α -メチルバリン	Dmval	N-シクロドデシルグリシン	Ncdod
D-N-メチルアラニン	Dnmala	N-シクロオクチルグリシン	Ncoct
D-N-メチルアルギニン	Dnmarg	N-シクロプロピルグリシン	Nepro
D-N-メチルアスパラギン	Dnmasn	N-シクロウンデシルグリシン	Ncund
D-N-メチルアスパルタート	Dnmasp	N-(2,2-ジフェニルエチル)グリシン	Nbhm
D-N-メチルシステイン	Dnmcys	N-(3,3-ジフェニルプロピル)グリシン	Nbhe

【0061】

【表3】

D-N-メチルグルタミン	Dnmgln	N-(3-guanidinoethyl)glycine	Narg
D-N-メチルグルタマート	Dnmglu	N-(1-hydroxyethyl)glycine	Nthr
D-N-メチルヒスチジン	Dnmhis	N-(2-hydroxyethyl)glycine	Nser
D-N-メチルイソロイシン	Dnmile	N-(isopropyl)glycine	Nhis
D-N-メチルロイシン	Dnmleu	N-(3-indolylethyl)glycine	Nhtrp
D-N-メチルリジン	Dnmlys	N-methyl-L-proline	Nmgabu
N-メチルシクロヘキシルアラニン	Nmchexa	D-N-methylmethionine	Dnmnet
D-N-メチルオルニチン	Dnmorn	N-methylcyclopentylalanine	Nmcpen
N-メチルグリシン	Nala	D-N-methylphenylalanine	Dnmphe
N-メチルアミノイソブチラート	Nmaib	D-N-methylproline	Dnmpro
N-(1-メチルプロピル)グリシン	Nile	D-N-methylserine	Dnmser
N-(2-メチルプロピル)グリシン	Nleu	D-N-methylthreonine	Dnmthr
D-N-メチルトリプトファン	Dnmtrp	N-(1-methylethyl)glycine	Nval
D-N-メチルチロシン	Dnmtyr	N-methyl-L-phenylalanine	Nmanap
D-N-メチルバリン	Dnmval	N-methylbenzylamine	Nmpen
γ -アミノブチル酸	Gabu	N-(p-hydroxyphenyl)glycine	Nhtyr
L-tert-ブチルグリシン	Tbug	N-(thiomethyl)glycine	Ncys
L-エチルグリシン	Etg	benzylamine	Pen
L-ホモフェニルアラニン	Hphe	L- α -methylalanine	Mala
L- α -メチルアルギニン	Marg	L- α -methylasparagine	Masn
L- α -メチルアスパルタート	Masp	L- α -methyl-L-proline	Mtbug
L- α -メチルシステイン	Mcys	L-methylthreonine	Metg
L- α -メチルグルタミン	Mgln	L- α -methylglutamate	Mglu
L- α -メチルヒスチジン	Mhis	L- α -methylhomophenylalanine	Mhphe
L- α -メチルイソロイシン	Mile	N-(2-methylthioethyl)glycine	Nmet
L- α -メチルロイシン	Mleu	L- α -methyllysine	Mlys
L- α -メチルメチオニン	Mmet	L- α -methylnorleucine	Mnle

【0062】

【表4】

L- α -メチルノルバリン	Mnva	L- α -メチルオルニチン	Morn
L- α -メチルフェニルアラニン	Mphe	L- α -メチルプロリン	Mpro
L- α -メチルセリン	Mser	L- α -メチルトレオニン	Mthr
L- α -メチルトリプトファン	Mtrp	L- α -メチルチロシン	Mtyr
L- α -メチルバリン	Mval	L-N-メチルホモフェニルアラニン	Nnhphe
N-(N-(2, 2-ジフェニルエチル)カルバ ミルメチル)グリシン	Nnbhm	N-(N-(3, 3-ジフェニルプロピル)カルバ ミルメチル)グリシン	Nnbhe
1-カルボキシ-1-(2, 2-ジフェニル-エ チルアミノ)シクロプロパン	Nmbc		

【0063】

クロスリンカーは、例えば、 $n=1$ ないし $n=6$ の $(CH_2)_n$ スパーサー基を有する二官能性イミドエステル、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルのごときホモ二官能性クロスリンカーおよび、通常は、N-ヒドロキシスクシンイミドのごときアミノ反応性部位および別の基に特異的な反応性部位を含有するヘテロ二官能性試薬を用いて、3Dコンホメーションを安定化させるのに用い得る。

【0064】

該ウイルス阻害の対象は、一般に、限定されないが、ヒト、霊長類、家畜（例えば、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ブタ）、ペット動物（例えば、イヌ、ネコ）、実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、ハムスター）、捕獲された野生動物（例えば、キツネ、シカ）である。好ましくは、該対象はヒトまたは霊長類である。最も好ましくは、該対象はヒトである。

【0065】

本発明の方法は、HIV感染およびAIDSの治療および予防に有用である。例えば、HIVに感染していることが分かっている対象において、Vp uイオンチャネル機能活性のダウンレギュレーションを達成して、HIVの複製を妨害し、それによって、AIDSの発症を予防することができる。あるいは、本発明の

方法を用いて、血漿中ウイルス量を低下させるか、またはAIDS症状を軽減することができる。

【0066】

本発明の方法は、HIV感染の初期に、単球およびマクロファージのごとき細胞型中でのウイルス貯蔵器の形成を妨げるため、あるいは、可能性のあるHIV感染源に曝される直前もしくはある期間の後に適用される予防的処置としてのいずれかにおいて、特に有用である。

【0067】

従って、もう一つの局面において、哺乳類におけるHIV感染またはAIDSの治療および／または予防のための方法が提供され、該方法は、HIV感染した哺乳類宿主細胞のVp uイオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とし、ここに、該ダウンレギュレーションは該HIVの機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する。

【0068】

より詳しくは、本発明は、哺乳類におけるHIV感染またはAIDSの治療および／または予防のための方法を提供し、該方法は、HIV感染した哺乳類宿主細胞のVp uイオンチャネル機能活性をダウンレギュレートするのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量の剤を投与することを特徴とし、ここに、該Vp uイオンチャネルダウンレギュレーションはHIV複製を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する。

【0069】

「有効量」への言及は、所望する応答を少なくとも部分的に達成するのに必要な量を意味する。

【0070】

本明細書中、「治療」および「予防」への言及は、最も広義に解釈されるべきである。「治療」なる語は、必ずしも、哺乳類が完全に回復するまで処置されることを示唆しない。同様に、「予防」は、必ずしも、該対象がいつかは疾患状態にかかることを意味しない。従って、治療および予防は、特定の状態の症状の軽

減または、特定の状態を進行させる危険性を妨げるか、さもなければ、低減することを含む。「予防」なる語は、特定の状態の徴候の重篤度を低減することと考えることができる。「治療」は、今ある状態の重篤度または痛烈な発作の頻度も低減するであろう。

【0071】

好ましくは、該剤はアミロライド・アナログまたはその機能相当物である。一層より詳しくは、該アミロライド・アナログはHMAまたはDMAである。

【0072】

この方法に従えば、1を超えるタイプの剤を投与するか、または該剤は、知られた抗ウイルス化合物もしくは分子のごときもう一つの剤とともに共投与することができる。「共投与」は、同一もしくは異なる経路での同一製剤もしくは2つの異なる製剤における同時投与または、同一もしくは異なる経路での連続投与を意味する。「連続」投与は、2つのタイプのアミロライド・アナログの投与間、または該アミロライド・アナログと該知られた抗ウイルス化合物もしくは分子との投与間で秒、分、時または日が異なるときを意味する。当該対象の剤および知られている抗ウイルス化合物または分子はいずれの順序でも投与することができる。

【0073】

投与の経路は、限定されないが、静脈内、腹膜内、皮下、頭蓋内、皮内、筋肉内、眼内、鞘内、大脳内、鼻腔内、注入、経口、経直腸、静脈点滴、貼付および移植を含む。静脈内経路が特に好ましい。

【0074】

本発明は、さらに、哺乳類におけるHIV感染またはAIDSの治療的または予防的処置用の医薬の製造における該対象の剤の使用にまで及び、ここに、該剤はHIV感染した細胞のV p uイオンチャネル機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する。

【0075】

好ましくは、該機能活性はHIV複製の媒介である。

【0076】

最も好ましくは、該剤はアミロライド・アナログまたはその機能相当物であり、さらにより好ましくは、HMAまたはDMAあるいはそれらの機能相当物である。

【0077】

上記したごとく、本発明者らは、驚くべきことに、アミロライドはV p uイオンチャネル機能活性になんら影響しないにもかかわらず、アミロライド・アナログは機能活性をブロックできることを確認した。

【0078】

従って、本発明のもう一つの局面は、対象において膜イオンチャネル機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、該方法は、膜イオンチャネル機能活性を阻害するのに十分な時間および条件下、該対象に有効量のアミロライド・アナログまたはその機能相当物を投与することを特徴とする。

【0079】

より詳しくは、本発明は、哺乳類においてV p uイオンチャネル機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、該方法は、V p uイオンチャネル機能活性を阻害するのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量のアミロライド・アナログまたはその機能相当物を投与することを特徴とする。

。

【0080】

さらにより詳しくは、本発明は、哺乳類においてH I V複製のV p uイオンチャネル媒介を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害する方法を提供し、該方法は、V p uイオンチャネル機能活性を阻害するのに十分な時間および条件下、該哺乳類に有効量のアミロライド・アナログまたはその機能相当物を投与することを特徴とする。

【0081】

好ましくは、該アミロライド・アナログは、ピラジン環またはその機能相当物の5-位のアミノ基の置換を含む。

【0082】

一層より好ましくは、該アミロライド・アナログはHMAまたはDMAである。

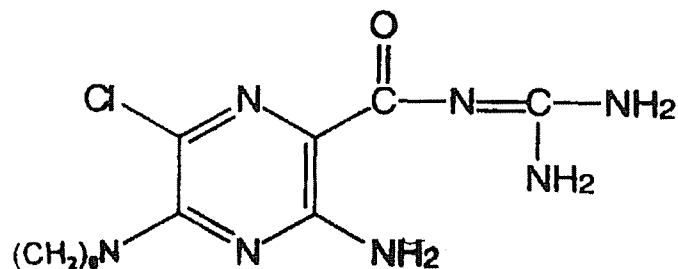
。

【0083】

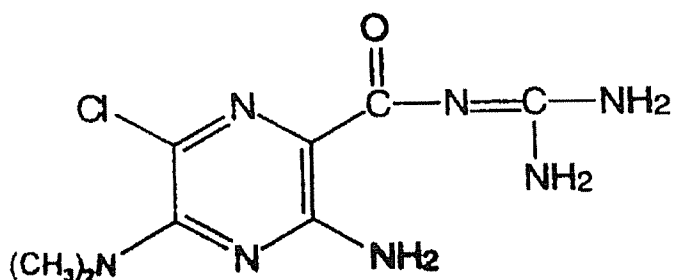
最も好ましくは、該アミロライド・アナログは構造：

【0084】

【化14】



HMA



DMA

【0085】

を含む。

【0086】

本発明のなおもう一つの局面は、上に定義したようなV p uイオンチャネル機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害するのに有用な剤を提供する

。

【0087】

好ましくは、該機能活性はH I V複製の媒介である。

【0088】

最も好ましくは、該剤はアミロライド・アナログまたはその機能相当物であり

、一層より詳しくは、該剤は、HMAもしくはDMAまたはそれらの機能相当物である。

【0089】

本発明のさらにもう一つの局面は、V p uイオンチャネル機能活性を低下させ、遅延させ、さもなければ、阻害するのに使用され、上で定義したような剤および1以上の医薬上許容される担体および／または希釈剤を含む組成物を提供する。該組成物は2つの異なるタイプの剤または、剤および知られている抗ウイルス化合物もしくは分子も含む。

【0090】

好ましくは、イオンチャネル機能活性の阻害は、H I V複製のV p uイオンチャネル媒介の阻害である。

【0091】

注射使用に適した組成物は、滅菌水溶液（ここに、水溶性）および滅菌注射液の即席調製用の滅菌粉末を含む。それらは、製造および貯蔵の条件下、安定でなければならず、細菌および真菌のごとき微生物の汚染作用に対して保護されるべきである。該担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液状ポリエチレングリコール等）、それらの適当な混合物および植物油を含有する溶剤または分散媒体であり得る。微生物の作用からの保護は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどの様々な抗菌剤および抗真菌剤により達成し得る。多くの場合、例えば、糖類または塩化ナトリウムなどの等張剤を含むことが好ましいであろう。該注射組成物の延長化された吸収は、該組成物において、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる剤の組成物の使用により達成し得る。

【0092】

滅菌注射液は、必要量の有効成分を上にも列挙した様々な他の成分と共に該適当な溶剤に配合し、必要であれば、引続き、例えば、濾過滅菌または他の適当な手段による滅菌により調製する。分散も意図され、これらは、様々な滅菌有効成分を塩基性分散媒体および上にも列挙されたものからの必要とされる他の成分を含有

する滅菌賦形剤に配合することによって調製する。滅菌注射液の調製用の滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、予め滅菌濾過した溶液から有効成分に加えていづれのさらなる所望する成分の粉末を生じる真空乾燥および凍結乾燥技術を含む。

【0093】

該有効成分が適切に保護されている場合、それらは、例えば、不活性希釈剤とともに、または同化可能な食用担体とともに経口投与することができ、あるいは、それはハードもしくはソフトシェルゼラチンカプセルに封入することができ、あるいは、それは錠剤に成型することができる。経口治療投与につき、該有効成分は補形剤と配合し、経口摂取錠剤、バッカル錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁剤、シロップ、ウエハス等の形態で使用する事ができる。そのような組成物および製剤は少なくとも1重量%の有効成分を含有すべきである。該組成物および製剤のパーセンテージは、もちろん、変化させることができ、好都合には、単位重量の約5ないし約80%の間であろう。そのような治療上有用な組成物中の有効成分の量は、適した用量が得られるような量である。本発明による好ましい組成物または製剤は、経口用量単位形態が約0.1mgおよび2000mgの間の有効成分を含有するように調製する。

【0094】

錠剤、トローチ、丸剤、カプセル等は、以下に列記する成分も含有する：ガム、アカシア、トウモロコシデンプンまたはゼラチンのごとき結合剤；ジカルシウムホスフェートのごとき補形剤；トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、アルギン酸等のごとき崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムのごとき滑沢剤；および、スクロース、ラクトースまたはサッカリンのごとき甘味剤、またはペパーミント、ウィンターグリーン油、またはチェリー香味料のごとき香味剤を添加することができる。該用量単位形態がカプセルの場合、それは、上記タイプの原料に加えて、液状担体を含有することができる。様々な他の原料をコーティング剤としてか、さもなければ、該用量単位の物理形態を修飾するために存在させることができる。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセルをシェラック、糖または両方で被覆することができる。シロップまたはエリキシルは、該有効成分、甘味剤として

スクロース、保存剤としてメチルおよびプロピルパラベン、チェリーまたはオレンジ香料のごとき染料および香料を含有することができる。いずれの用量単位形態を調製するのにも用いられるいずれの原料も、医薬上純粋で、適用される量において実質的に非毒性であるべきである。さらに、該有効成分は、徐放性調製物および製剤に配合することができる。

【0095】

本発明は、クリーム、ローションおよびジェルのごとき局所塗布に適した形態にも及ぶ。そのような形態において、抗凝血ペプチド (the anti-clotting peptides) は、表面バリアの浸透ができるように修飾する必要があるであろう。

【0096】

医薬上許容される担体および／または希釈剤は、いずれのおよび全ての溶剤、分散媒体、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤等を含む。医薬上活性な物質についてのそのような媒体および剤の使用は当該分野でよく知られている。いずれかの従来の媒体または剤が該有効成分と適合しない場合を除き、治療組成物におけるそれらの使用が意図される。補足有効成分も該組成物に配合し得る。

【0097】

投与の容易および用量の均一性のために、非経口組成物を用量単位形態に調剤することが特に有利である。本明細書に用いられる用量単位形態は、処置すべき哺乳類対象に対して一体的な用量として適した物理的に分割された単位を意味し；各単位は所望する治療効果を生じるように算出された所定量の有効成分を必要な医薬担体と一緒に含有する。本発明の新規な用量単位形態の仕様は、(a) 該有効物質に特有な特徴および達成すべき特定の治療効果、および (b) 調合技術に固有の限界に影響され、かつ、それらに直接依存する。

【0098】

本発明により意図される有効量は、痛みの重篤度および当該受領者の健康および年齢に依存して変化するであろう。一般的に言えば、有効量は、 0.01 ng/k g 体重から約 100 mg/k g 体重まで変化するであろう。代替量は、約 0.1 ng/k g 体重ないし約 100 mg/k g 体重、または、 1.0 ng/k g

体重ないし約80mg/kg体重を含む。

【0099】

以下の実施例に、本発明のさらなる特徴をより完全に説明する。しかしながら、詳細な説明は単に本発明を例示する目的のためだけに含まれるものと理解すべきである。決して、上記した本発明の広い説明を制限するものとして理解すべきではない。

【0100】

【実施例】

実施例1

組換えプラスミドp2GEXVpおよびpPLVpの構築

Vpをコード化するオープンリーディングフレーム(図1a)をHIV-1ゲノム(単離HXB2、McFarlane Burnet Centre, Melbourne, Australia)のNde1フラグメントのcDNAクローンからPCRにより増幅した。天然PfuDNAポリメラーゼ(Stratagene; 0.035 U/μl)を選び、該PCR反応を触媒して、起こり得るPCR導入エラーを酵素のブルーフリーディング活性により最小限にした。当該5'、センス、プライマー、AGTAGGATCCATGCAACCTATACC(<400>2)は、p2GEX(41)中のGST遺伝子の3'末端とインフレームでクローニングするためのBamH1サイト(下線)を挿入する。このプライマーは、該HXB2単離体のトレオニンコドンであるvp遺伝子の開始コドン(太字TはCを代替する)も修復する。当該3'、アンチセンス、プライマーTCTGGAATTCTACAGATCATCAAC(<400>3)は、該PCR産物の他の末端にEcoR1(下線)を挿入して、クローニングを容易にする。Perkin-Elmerサーモサイクラーにおいて、0.5ml薄壁エッペンドルフチューブ中で94℃にて45秒間、55℃にて1分間および72℃にて1分間の30サイクル後、268bpフラグメントを精製し、BamH1およびEcoR1で消化し、次いで、同じ2つの酵素での消化により調製されたp2GEXにライゲートした。得られた組換えプラスミドを図1bに示す。全Vpオープンリーディングフレームおよび、BamH1ならびにEcoR1ライゲーションサイトをApplied Biosystems dye-terminatorキ

ットを用いる、環状配列決定により配列決定して、該DNA配列を確認した。

【0101】

pPL451発現プラスミドに挿入するためのVpuオープンリーディングフレームを調製するために、先ず、p2GEXVpuをBamH1で消化し、次いで、5'塩基オーバーハングをdNTPの存在下、クレノウDNAポリメラーゼに充填した。次いで、Vpuコード化フラグメントをEcoR1での消化によって遊離させ、寒天ゲルから精製し、Hpa1およびEcoR1で消化されているpPL451にライゲートした。引続いて、ウェスタンブロットは、pPLVpu構築物(図1c)が、PRおよびPLプロモータのcI857レプレッサーを不活性化するために42℃にて培養へ導入した後、Vpuを発現したことを確認した。

【0102】

実施例2

Vpuの免疫同定用のポリクローナル抗体の育成

VpuのC-末端の20個のアミノ酸残基に対応するペプチドCALVEMGVEMGHHAPWDVDDL(<400>4)は、Applied Biosystems model 477A machineを用いてBiomolecular Resource Facility(ANU, Australia)中で合成する。多重抗原性ペプチド(MAP)は、N-末端システイン残基を介して該ペプチドをポリリジンコアに結合させることによって調製した[Lu et al., 1991]。該MAPを用いて、VpuのC-末端を認識するポリクローナル抗血清の産生のためにウサギを免疫化した。免疫化のため、1mgのMAPペプチドを1.25mlのMTPBS(16mM Na₂HPO₄、4mM NaHPO₄、150mM NaCl pH7.3)に溶解し、1.25mlのフロイント完全アジュバントで乳化させ、該ウサギの背中の複数の皮下部位に注射した。追加免疫注射はフロイント不完全アジュバントを用い、少なくとも4週間の間隔を開け、注射してから10~14日後に血清を採取した。

【0103】

実施例3

抗体に関する技術

ペプチド-特異的抗体は、PierceのImmunopureTM Ag/Ab 固定化キットを用いてウサギ血清から精製した。当該合成ペプチドは、該キットの指示に従い、そのN-末端システインを介して5 ml Sulfo LinkTM カラムのマトリックスに架橋させ、2.5 mlのVpu免疫活性血清を20 mlのトリスバッファー (10 mM pH 7.4) に添加し、該ペプチドカラムに3回通して該抗体の該ペプチドへの暴露を最大限にした。該カラムを20 mlの10 mM トリス pH 7.4に引続き、500 mM NaClで補足した20 mlの同一バッファーで洗浄した。結合した抗体を5 mlの100 mM グリシン/150 mM NaCl、pH 2.5中で溶出し、溶出液を250 μ lの1 M トリス pH 9.0の添加により即座に中和し、MTPBSに対して一晚透析した。

【0104】

前記したごとく [Harlow and Lane, 1988]、二官能性架橋試薬ジメチルピメルイミダートを用いて、200 μ gの精製した抗体を100 μ gのタンパク質A寒天ビーズ [Schleicher and Schuell] に共有的に架橋させることによって、抗Vpu免疫アフィニティーカラムを構築した。

【0105】

およそ5倍過剰の精製抗体の存在下で試料をインキュベーションし (室温にて1時間)、引続き、過剰なタンパク質-A寒天の添加、30分間のインキュベーション、および遠心して該Vpu-抗体複合体をペレットにすることによって、Vpuの免疫沈澱を行った。上清は、後で電気生理学的二重層実験における対照として用い、ウェスタンブロッティングにより試験してVpuが完全に除去されてしまったことを確認した。タンパク質試料は、ミニゲル装置および予め注入されたゲル (Novex) を用いる均一な18% SDSポリアクリルアミドゲル上で電気泳動させた。試料は、ゲルに負荷する前に、SDS (最終3.2%) およびメルカプトエタノール (最終0.8%) で60℃にて5分間処理した。タンパク質バンドをクマシーブリリアントブルーR250で、または銀染色によってのいずれかで可視化した。

【0106】

ウェスタンブロッティングのため、半乾燥の移動装置 (Pharmacia LKB) を

用いてタンパク質をアクリルアミドゲルからPVDF膜に移した。ポリクローナル抗血清または精製抗体、ヤギ抗ウサギアルカリ性ホスファターゼコンジュゲートおよびWestern BlueTM 固定化基質 (Promega) との該ブロットの連続する反応の後、V p uを検出した。

【0107】

実施例 4

E. COLIからの組換えVPUの精製

p 2 G E X V p uを含有するE. coli株XL1-ブルー細胞の培養を30℃にて激しく曝気しつつ、グルコース (6 g/L) およびアンピシリン (50 mg/L) で補足したLB培地中で増殖させて、約250クレット単位 (Klett units) の密度にし、その時点で、IPTGを添加して0.01 mMの最終濃度にし、増殖をさらに4時間続けた。最終培養密度は約280クレット単位であった。初期の実験が、大部分の発現されたGST-V p u融合タンパク質は細胞デブリおよび膜断片の両方に関連することを明かにしたので、Varadhachary およびMaloney の方法 [Varadhachary and Maloney, 1990] を採用して、初期精製ステップのために、(細胞デブリと膜断片の両方を結合する) 浸透圧的に崩壊した細胞ゴーストを単離した。細胞を収穫し、洗浄し、計量し、DTT (1 mM) およびMgCl₂ (10 mM) を含有するMTPBS中に再懸濁させて10 ml/g 湿潤重量にした。リゾチーム (0.3 mg/ml ; ニワトリ卵白 ; Sigma) を添加し、穏やかに揺動しつつ氷上で30分間に引続き37℃にて5分間インキュベートした。浸透圧的に増感された細胞を12,000 gにてペレットにし、元の体積にまで水中で再懸濁させて、該細胞を破裂させた。次いで、該懸濁物を10×バッファー母液を用いて1×MTPBS/DTTにし、該ゴーストを遠心により単離し、MTPBS/DTTに再懸濁させ、次いで、それに、グリセロール (20重量%/体積まで) およびCHAPS (2重量%/体積まで) を連続的に添加して、元の体積の4分の1の最終体積を得た。この混合物を氷上で1時間攪拌し、次いで、400,000 gにて1時間遠心して不溶物質を除去した。GST-V p u融合タンパク質は、グルタチオン寒天樹脂 (Sigma) 上のアフィニティクロマトグラフィーにより、界面活性剤抽出物から精製した。該樹脂をグリセロ

ール (5%)、DTT (1mM)、およびCHAPS (0.5%) を含有する50mM トリス pH7.5 (バッファーA) 中で完全に洗浄し、次いで、該融合タンパク質のVpu部分を遊離させ、ヒト・トロンビンを持つビーズの50% (v/v) 懸濁液の処理によって (100U/ml; 37℃にて1時間)、樹脂結合GSTから溶出した。PMSF (0.5mM) を該溶出液に添加して、いずれの残存トロンビン活性をも失活させた。BioRad HPLCに結び付けられ、バッファーA中の線形NaCl勾配 (0~2M) で溶出するMA7Q陰イオン交換カラムで、このVpu画分をさらに精製した。

【0108】

該Vpuを免疫アフィニティーカラム上で以下のように、均質 (銀染色ゲル上で決定された) にまで精製した: Vpuを含有するHPLCをバッファーA中、NAPカラム上で脱塩し、次いで、該抗体-寒天ビーズと室温にて1時間混合した。該ビーズを完全に洗浄し、Vpuを該塩濃度を2Mまで増加することによって溶出した。タンパク質をBioRadダイ結合アッセイを用いて定量した。

【0109】

実施例5

リン脂質ベシクルにおけるVPUの再構成

Vpuを含有するプロテオリポソームを界面活性剤希釈法 [New, 1990] によって調製した。クロロホルムに溶解させた脂質 (PE:PC:PS; 5:3:2; 1mgの全脂質) の混合物を窒素ガス流下で乾燥し、DTT (1mM) を含有する0.1mlのリン酸カリウムバッファー (50mM pH7.4) に再懸濁させた。精製したVpuを含有する25μlアリコートを追加し、引続いて、1.25% (wt/vol) の最終濃度のオクチルグルコシドを追加した。この混合物を3ラウンドの液体窒素中の凍結、解凍およびバス型超音波発生器中での超音波照射 (20~30秒間) に付し、次いで、200体積のリン酸カリウムバッファー中で急速に希釈した。プロテオリポソームを400,000gにて1時間の遠心により収集し、約150μlのリン酸バッファー中に再懸濁させた。

【0110】

実施例6

イオンチャネル活性の検定

精製Vpuを別記された標準技術 [Miller, 1986; およびPiller et al., 1996]を用いて、平面脂質二重層におけるチャネル活性を誘導するその能力につき試験した。CISおよびTRANSチャンバー中の溶液を直径約100 μ mの小さな円形の孔を含有するDelrinTM プラスチック壁で隔て、ここに、それを横切って、高抵抗電気シールを形成するように脂質二重層が塗布されている。二重層はn-デセン中のパルミトイル-オレオリ-ホスファチジル-エタノールアミンとパルミトイル-オレオリ-ホスファチジル-コリンとの混合物(8:2) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama) から塗布した。該2つのチャンバーの溶液は、様々なNaClまたはKClの濃度が添加されたMESバッファー(10 mM、pH 6.0)を含有した。電流をAxopatchTM 200アンプで記録した。該2つのチャンバー間の電気ポテンシャルを±200 mVの間で操作し得た(TRANS対接地CIS)。界面活性剤溶液としてか、または、リン脂質ベシクルへの該タンパク質の組入れ後に、Vpuを含有するアリコート将该CISチャンバーに添加した。該チャンバーを電流が観察されるまで攪拌した。

【0111】

実施例7

ヒトの単球およびマクロファージにおけるHIV複製への

HMAおよびDMAの効果の試験

ヒト単球を末梢血液から単離し、24時間(1日齢単球)か7日間かのいずれか培養して単球由来マクロファージ(MDM)へ分化させた。次いで、これらの細胞をHIV単離体の細胞フリー調製物に暴露し、該培地の完全アスピレーション前に2時間吸収させ、ウイルスフリー培地で1回洗浄し、新鮮な培地に再懸濁させた。該細胞を感染の24時間前か、または感染後のいずれかに50~100 μ M HMAまたはDMAに暴露した。感染後様々な時間にて、その後のHIV複製を薬物に暴露した細胞内と、薬物に暴露していない細胞(対照)内とで比較した。ウイルス複製の進行および程度をHIV DNA PCR法 [Fear et al., 1998] またはELISA法のいずれかを用いてアッセイして、培養上清中のp24を定量した [Kelly et al., 1998]。

【0112】

実施例8

E. COLI中のVPUの発現および精製

プラスミドp2GEXVpu (図1)を構築して、該GSTとVpuオープンリーディングフレームとの間のインフレーム遺伝子融合体を生成した。この系は、GSTのC-末端に融合したVpuポリペプチドのIPTG-誘発性発現を可能にし、グルタチオン寒天上のアフィニティークロマトグラフィーによる該融合タンパク質の精製を許容した。

【0113】

該培養を30℃にて約250~300クレット単位にまで増殖させ、低レベルのIPTGで誘発することによって、GST-Vpu発現の最適レベルを得た。該GST-Vpuを精製するため、該細胞デブリおよび形質膜を含有する合わせた細胞断片を該誘発細胞のリゾチームを処理した後に低速遠心することによって調製した。該GST-Vpuタンパク質の約50%を両性イオン界面活性剤CHAPSを用いて、この断片から可溶化し得た。グルタチオン-寒天ビーズを用いるアフィニティークロマトグラフィーを用いて、該融合タンパク質を濃縮し、トロンビンを用いて、該融合タンパク質を融合パートナー間の高親和性トロンビンサイトにて切断してVpuを遊離させた(図2A)。陰イオン交換カラムから溶出した画分において、Vpuは銀染色ゲル上で可視できる主たるタンパク質であった(図2B、レーン1)。最後に、Vpuを免疫アフィニティークラム上で見かけ上の均一まで精製した(図2B、レーン2)。(SDS-PAGEゲルから切出された)タンパク質バンドのN-末端アミノ酸配列が該免疫検出されたタンパク質に対応することにより、Vpuとしてのその同一性を確認した。

【0114】

実施例9

脂質二重層においてVPUがイオンチャネルを形成する

Vpuによるイオンチャネル形成をアッセイするため、平面脂質二重層への再構成を行った。精製した組換えVpuの(7および70ngの間のタンパク質を含有する)試料を二重層組織のCISチャンバー中の1mlのバッファーに添加

した場合、攪拌期間後に電流の変動が検出され、2ないし30分間変化した(図3)。チャネル活性が観察されるまでにかかった時間は、ほぼ、該チャンバーに添加したタンパク質の量に相関した。対照バッファーアリコートまたは対照脂質ベシクルを該CISチャンバーに添加した場合、チャネルは検出されなかった。それらの対照実験において、チャネル活性が出現せずに1時間以上も攪拌し得た。

【0115】

実施例10

VPUチャネルの特性

チャネル活性は、5つの独立した精製から調製されたVpu試料で40を超えて個々の実験において観察した。種々の実験において、該電流の振幅は広い範囲で変化し、ここでも、タンパク質の添加量にほぼ相関するようであった。測定した最大および最小のチャネルは、それぞれ、14 pSおよび280 pSのコンダクタンスであった。Vpuを含有する脂質ベシクルを調製し、該二重層に融合させたときは、界面活性剤中の精製タンパク質を添加したときよりも、該チャネルは一貫してより低かった。これは、前者の方法が高濃度の界面活性剤での処理および、大きな凝集の単体への崩壊を促進するであろう希釈ステップを含むからであろう。

【0116】

電流振幅と電圧との関係は線形であり、10倍のNaCl勾配(500 mM CIS; 50 mM TRANS)を含有する溶液中の逆電位は+30 mVであった(図3B)。NaClの代りにKClを含有する溶液でも同様の逆電位が観察された。膜のいずれかの側の溶液におけるNaClまたはKClのいずれかでの5つの実験において、平均逆電位は 31.0 ± 1.2 mV (\pm SEM)であった。これは、陽イオンのみを選択的に透過させるチャネルについての予測よりもより負であった。Goldman-Hodgkin-Katz式にイオン活性を用いて、約5.5の P_N / P_{Cl} 比を得、それは、チャネルが塩化物イオンも透過させることを示している。NaCl勾配の代りにNa⁺-リン酸勾配(150 mM Na⁺ & 100 mM リン酸 CIS; 15 mM Na⁺ & 10 mM リン酸 TRANS、pH 6.8

)を用いた場合、逆電位は $37.1 \pm 0.2 \text{ mV}$ ($\pm \text{SED}$, $n=2$)であって、約5の陽イオン/陰イオン透過比率を示した。(リン酸溶液に関わる計算については、1価および2価の陰イオンの合計活性を用い、2つの種は等しく透過性であると仮定した。)今度は、電流-電圧曲線は該 NaCl 溶液においては見られなかった整流を示した。 V_{pu} により形成されたチャネルは、 Na^+ および K^+ に対して等しく透過性であり、それよりも低い程度であるが、塩化物イオンならびにリン酸イオンに対しても透過性であると結論付け得る。

【0117】

実施例11

薬物をブロックする電位イオンチャネルの

スクリーニングのためのバイオアッセイ

該 V_{pu} イオンチャネルをブロックする薬物調査の一部として、新規バイオアッセイが開発され、二重層アッセイで行われたならば、法外に遅いであろうスクリーニング方法を容易にした[Ewart et al., 1996]。このバイオアッセイは、*E. coli*における V_{pu} の発現が経膜ナトリウム勾配を消失させる形質膜に配置される能動的 V_{pu} チャネルを生じるという観察に基づく。この V_{pu} チャネル活性の結果として、細胞内の蓄積がナトリウム依存性共輸送に媒介される代謝物(例えば、プロリンまたはアデニン)は、該代謝物の細胞内レベルが該細胞の増殖の限界に達するまで合成されるよりも速く細胞から流出する。従って、 V_{pu} を発現する*E. coli*細胞は、アデニンまたはプロリンを欠如する最小限ドロップアウト培地(minimal drop-out media)中で増殖することは不可能である。しかしながら、該 V_{pu} チャネルをブロックする薬物の存在下、該細胞は、その膜貫通ナトリウム勾配を—該膜中の他のイオンポンプの作用のおかげで—もう一度再構成することが可能であり、代謝物の流出が妨げられて、増殖を可能とする。 V_{pu} が*E. coli*の形質膜中でナトリウムチャネルを形成し得ることを立証する実験を以下のように行った: 未融合 N_{pu} を*E. coli*中で発現するため、該 V_{pu} オープンリーディングフレームをプラスミドpPL451(19)中へクローン化して、組替えプラスミドpPL- V_{pu} を生成した(図1b)。このベクターにおいて、強力な P_L および P_R ラムダプロモータを用いて

、30℃にて増殖させたとき、非常に抑制され、温度を37℃および42℃の間にまで上昇させることによって誘発し得るような温度感受性cI857の制御下でVpuを発現させる。寒天プレート上、pPL-Vpuを含有する細胞は、30℃および37℃にてインキュベートしたときは増殖し、42℃では増殖せず、一方、対照株は42℃にてよく増殖した。pPL-Vpuを含有する細胞の液体培養を30℃にて $OD_{600} = 0.84$ にまで増殖させ、次いで、42℃にて2時間増殖を始めた（最終細胞密度は $OD_{600} = 0.75$ ）。形質膜断片を調製し、VpuのC-末端に特異的に結合する抗体を用いるウェスタンブロットは約16kDaに単一バンドを検出し、それはVpuが発現され、該膜に関連していることを示している（図2A、レーン5）。

【0118】

実施例12

クロスフィーディング実験は、VPUを発現する細胞から

プロリンが流出することを明かにする

E. coli によるプロリンの摂取はよく特徴付けられており、該細胞内へのアミノ酸の能動的輸送は、エネルギー源としてナトリウム勾配を用いることが知られている[Yamamoto et al., 1994]。プロリン漏洩が起るかどうかが検出するため、以下のクロスフィーディングアッセイを用いた：プロリンおよびメチオニン(Met^- 、 Pro^-)に対して栄養素要求性のE. coli 株のローン(lawn)を蒔き、プロリンを欠如するがメチオニンは含有する最小限ドロップアウト培地プレート上にソフト寒天オーバーレイとして注ぎ込んだ。滅菌有孔フィルターディスクをpPL451対照プラスミドまたはpPL-Vpuのいずれかを含有する $Met^+ Pro^+$ 株(XL-1ブルー)で接種し、該ソフト寒天上に載せた。次いで、該プレートを37℃または30℃にて2日間インキュベートした。その後、 $Met^- Pro^-$ 株のハロー増殖が、37℃にてインキュベートされたpPL-Vpuを含有する細胞で接種されたディスクを取巻いているのがはっきりと見えた(図4A)。この増殖は、単に、該ディスク上のVpu-発現細胞からのプロリンの漏洩によるものであろう。そのような漏洩は37℃にての対照株からも30℃にて増殖したプレート上のいずれの株の周囲にも見られなかった(

図4B)。

【0119】

プロリン輸送とは対照的に、E. coli メチオニンパミアーゼはABCトランスポーターファミリーに属することが知られており [Rosen, 1987]、それゆえ、ATPにより活性される。上記のものと同一のクロスフィーディング実験は、Me e t - P r o 株がメチオニンを欠如するが、プロリンを含有する最小限ドロップアウトプレート上に塗り広げられたことを除き、同一のクロスフィーディングを行った。この株の増殖はいずれのディスクの周りでも明白ではなく (図4c)、メチオニンはV p uが発現されてとしても該XL-1ブルー細胞から漏洩しないことを示す。

【0120】

実施例13

VPUを発現するE. COLI細胞は、
増殖のため外部培地中にアデニン必要とする

アデニン合成経路における特徴付けられていない突然変異のため、V p uを発現するXL1-ブルー株のE. coli細胞の37℃における増殖は、該培地中のアデニンの存在に依存した。これは、上記のプロリンクロスフィーディングアッセイよりも一層簡易なV p uイオンチャネル活性のバイオアッセイの開発を可能にする：該pPL-V p uプラスミドを含有するXL1-ブルーのローンを該培地中にアデニンを欠如する寒天プレートに蒔き、該V p uチャネルの阻害につき試験すべき薬物の小アリコートを経天上の離れた場所にスポットし、該プレートを37℃にて適当な時間(12~36時間)インキュベートする。特定の薬物塗布サイトの周りの増殖のハローは、該薬物が、該薬物の不存在的下では増殖を妨げるV p uイオンチャネル活性の発現を阻害していたことを示す。

【0121】

実施例14

バイオアッセイは電位チャネルブロッカーとしての

5-(N,N-ヘキサメチレン)-アミロライドを明かにする

このアッセイを用いて、多数のアマンタジン誘導体を試験したが、チャネル活

性に影響しないことが分かった。しかしながら、多数のアミロライド誘導体も試験し、5-(N, N-ヘキサメチレン)-アミロライド(HMA)を塗布したサイト周りの増殖のハローは、この薬物を可能性のあるVpuチャンネルブロッカー(図5)と同定した。置換されていないアミロライドはこれらのプレート上で細菌増殖のハローを生じなかった。

【0122】

実施例15

平面脂質二重層実験はHMAを VPUチャンネルインヒビターと確認する

HMAによるVpuイオンチャンネル活性の阻害が、平面脂質二重層実験において確認され(図6)、濃度50~250 μ M HMAが該チャンネルを通るイオン流ブロックすることが分かった。元の化合物、アミロライド、および他の誘導体、5-(N, N-ジメチル)-アミロライド(DMA)も同様に平面脂質2分子層実験において試験した: DMAはイオンチャンネル活性を阻害することが分かったが、HMAほど効力的ではなかった。アミロライド自体はこれらの濃度にて、チャンネルブロッカーとして活性ではなかった。

【0123】

実施例16

HMAおよびDMAはヒト単球およびマクロファージにおける HIV-1複製を阻害する

次なる試験を行って、HMAおよびDMAに何らかの抗ウイルス活性があるかどうかを立証した。2つの試験を行って、ヒトの単球およびマクロファージにおけるHIV複製に対する該薬物の効果を特徴付けた: (a) PCRベースのアッセイを用いて、HIVゲノムの逆転写から生じる新たに合成したDNAを検出した、ウイルス複製の早い段階; (b) ELISA法を用いてウイルス性タンパク質p24の産生を定量し、該複製プロセスの遅い段階を反映する。該PCRの結果は、DMAは、50 μ Mにて細胞においてHIV DNAの合成を阻害し; HMAは、50 μ Mにて、細胞にとって毒性であった — この薬物のより低濃度にてさらなる試験を行う。p24 ELISA結果は、DMA (50 μ M、データ

は示さず)でも、非毒性レベル(10 μ M)にて使用したときはHMA(図7)でも、両方でHIVビリオン合成の明確な阻害を示し;図7Aは単球へのHMAの効果を示し、図7Bは、マクロファージへのHMAの効果を示す。

【0124】

当業者は、本明細書に記載された本発明が特別に記載されたもの以外の変形および修飾を許容することを認識するであろう。本発明はすべてのそのような変形および修飾を含むと理解されるべきである。本発明は、本明細書に個別にまたは集約的に言及したかあるいは、示した全てのステップ、特徴、組成物および化合物、および、いずれの2以上のステップまたは特徴のいずれのおよび全ての組合せも含む。

【0125】

参考文献一覧

- Barry, M., Mulcahy, F. and Back, D.J., Br J Clin Pharmacol, 45: 221-8. (1998)
- Deeks, S.G., West J Med, 168:133-9. (1998)
- Miles, S.A., J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 16 Suppl 1:S36-41. (1997)
- Miles, S.A., J. Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 16 Suppl 1: S1-2. (1998)
- Moyle, G.J., Gazzard, B.G., Cooper, D.A. and Gatell, J., Drugs, 55:383-404, (1998)
- Rachlis, A.R. and Zarowny, D.P., Cmaj, 158:496-505. (1998)
- Vella, S., Fragola, V. and Palmisano, L., J Biol Regul Homeost Agents, 11:60-3. (1997)
- Volberding, P.A. and Deeks, S.G., Jama, 279: 1343-4. (1998)
- Volberding, P.A., Hosp Pract (Off Ed), 33:81-4, 87-90, 95-6 passim. (1998)
- Miller, R.H. and Sarver, N., Nat Med, 3:389-94. (1997)

- Mitsuya, H., *Enzyme Inhibition*, 6:1-8. (1992)
- Moore, J.P., *Science*, 276:51-2. (1997)
- Thomas, M. and Brady, L., *Trends Biotechnol.*, 15: 167-72. (1997)
- Balliet, J.W., Kolson, D.L., Eiger, G., Kim, F.M., McGann, K.A., Srinivasan, A. and Collman, R., *Virology*, 200:623-31. (1994)
- Westervelt, P., Henkel, T., Trowbridge, D.B., Orenstein, J., Heuser, J., Gendelman, H.E and Ratner, L., *J Virol*, 66:3925-31. (1992)
- Ewart, G.D., Sutherland, T., Gage, P.W. and Cox, G.B., *J Virol*, 70:7108-7115. (1996)
- Schubert, U., Henklein, P., Boldyreff, B., Wingender, E., Strebel, K. and Porstmann, T., *J Mol Biol*, 236: 16-25, (1994)
- Friberg, J., Ladha, A., Gottlinger, H., Haseltine, W.A. and Cohen, E.A., *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirology*, 8: 10-22. (1995)
- Love, C.A., Lilley, P.E. and Dixon, N.E., *Escherichia coli*. Gene, in press. (1996)
- Yamato, I., Kotani, M., Oka, Y. and Anraku, Y., *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 269:5729-5724. (1994)
- Rosen, B.R., *ATP-coupled solute transport systems. Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and molecular biology 1*: (1987) Editor: Neidhardt, F.C. American Society for Microbiology.
- Piller, S.C., Ewart, G.D., Premkumar, A., Cox, G.B. and Gage, P.W., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:111-115. (1996)
- Lu, Y.A., Clavijo, P., Galantino, M., Shen, Z.Y., Liu, W. and Tam, J.P., *Molecular Immunology*, 28:623-630. (1991)
- Harlow, E. and Lane, D., (1988) *Antibodies: A laboratory manual*. (ed). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 'Vol:'.

Varadhachary, A. and Maloney, P.C., *Molecular Microbiology*, 4:1407-1411.

(1990)

New, R.C.C., (1990), *Liposomes: A practical approach*, The Practical Approach Series. Rickwood, D., Hames, B.D. (eds). IRL Press, Oxford, pages, Miller, C., (1986) *Ion channel reconstitution*. (ed). Plenum Press, New York and London, 'Vol:'. .

Fear, W.R., Kesson, A.M., Naif, H., Lynch, G.W. and Cunningham, A.L., *J. Virol*, 72:1334-1344. (1998)

Kelly, M.D., Naif, H., Adams, S.L., Cunningham, A.L. and Lloyd, A.R., *J. Immunol*, 160:3091-3095. (1998)

New, R.C.C. (ed.), *Liposomes: a practical approach*. IRL Press, Oxford (1990)

Grice, A.L., Kerr, I.D. and Sansom, M.S., *FEBS Lett*, 405(3):299-304 (1997)

Moore, P.B., Zhong, Q., Husslein, T. and Klein, M.L., *FEBS Lett*, 431(2):143-148 (1998)

Schubert, U., Bour, S., Ferrermondiel, A.V., Montal, M., Maldarelli, F. and Strebel, K., *Journal of Virology*, 70(2):809-819 (1996a)

Willbold, D., Hoffmann, S. and Rosch, P., *Eur J Biochem*, 245(3):581-8 (1997)

Wray, V., Kinder, R., Federau, T., Henklein, P., Bechinger, B. and Schubert, U., *Biochemistry*, 38(16):5272-82 (1999)

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> THE AUSTRALIAN NATIONAL UNIVERSITY

<120> A METHOD OF MODULATING ION CHANNEL FUNCTIONAL ACTIVITY

<130> 2222985/TDO

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 82

<212> PRT

<213> HIV

<400> 1

Met Gln Pro Ile Pro Ile Val Ala Ile Val Ala Leu Val Val Ala Ile
 1 5 10 15

Ile Ile Ala Ile Val Val Trp Ser Ile Val Ile Ile Glu Tyr Arg Lys
 20 25 30

Ile Leu Arg Gln Arg Lys Ile Asp Arg Leu Ile Asp Arg Leu Ile Glu
 35 40 45

Arg Ala Glu Asp Ser Gly Asn Glu Ser Glu Gly Glu Ile Ser Ala Leu
 50 55 60

Val Glu Met Gly Val Glu Met Gly His His Ala Pro Trp Asp Val Asp
 65 70 75 80

Asp Leu

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> HIV

<400> 2

agtaggatcc atgcaaccta tacc

24

```

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> HIV

<400> 3
tctggaattc tacagatcat caac
24

<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> HIV

<400> 4
Cys Ala Leu Val Glu Met Gly Val Glu Met Gly His His Ala Pro Trp
1          5          10          15
Asp Val Asp Asp Leu
20

```

【図面の簡単な説明】

【図1 a-c】 図1は、E. coli中のVpuの発現に用いたプラスミドの概略表記である。A. HIV-1株HXB2 cDNAクローンからPCRにより発生したvpuオープンリーディングフレーム（ORF）によりコード化されるアミノ酸配列（<400>1）。該vpuORFをp2GEX中のGST遺伝子の3'末端にインフレームでクローン化してp2GEXVpuを生じた（B）。引続き、それをpPL451にクローン化して、プラスミドpPL+Vpuを産生した（C）。

【図2 a-b】 図2は、E. coli中のVpuの発現および精製の写真表記である。A. SDS-PAGE後にウェスタンブロッティングを用いて、E. coliエキス中に発現したVpuを検出した。レーン1～4はp2GEXVpuから発現したVpuの種々の精製段階にての試料を含有する：レーン1、グルタチオン-寒天アフィニティークロマトグラフィーにより単離されたGST-Vpu融合タンパク質；レーン2、トロンビンの処理により該融合タンパク質から遊離されたVpu；レーン3、HPLC陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製されたVpu；レーン4、イムノアフィニティークラムを通過させた後のVpu。レーン5およびレーン6、それぞれ、pPL+VpuまたはpPL451を含有する42℃誘発細胞から調製した膜ベシクル。B. 銀染色SDS-P

AGEゲル：レーン1、HPLC陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製されたVpu；レーン2、該イムノアフィニティーカラムを通過させた後のVpu。

【図3a-b】 図3は、精製Vpuを含有するアリコートに脂質二重層を暴露した後に観察されたイオンチャネル活性のグラフ表記である。AおよびBにおいて、CISチャンバーは500mM NaClを含有し、TRANSチャンバーは50mM NaClを含有し；両方の溶液は10mM MESでpH6.0にバッファー化された。Bは、Aに示したものと同様のデータから作成した電流対電位曲線を示す。

【図4a-c】 図4は、細菌クロスフィーディングアッセイの写真表記である。全プレートにつき、Met⁻、Pro⁻ 栄養素要求性株を用いて、ソフト寒天オーバーレイに蒔いた。プレートAおよびBは、プロリンのない最小限ドロップアウト培地を含有し；プレートCにおいて、該培地はメチオニンのないものである。バックグラウンドローンにおける細胞の生存率を制御するため、PおよびMが標識されたディスクは、それぞれ、追加プロリンまたはメチオニンを含有した。CおよびVが標識されたディスクは、それぞれ、プラスミドpPL452またはpPL+vぷを含有するMet⁺、Pro⁺ E. coli細胞で接種された。プレートを37℃にて（AおよびC）または30℃にて（B）2日間インキュベートし、黒色背景上で、該プレートの下に配置された蛍光ライトからの周辺発光で撮影した。該像を、Novaline Video ゲルドキュメンテーションシステムで記録した。全プレート上でPまたはMが標識されたディスクの周り、およびプレートA上でVが標識されたディスクの周りの光ハローはバックグラウンドローン株を示す。

【図5】 図5は、可能性のあるVpuチャネルブロッカーについての薬物のスクリーニングのグラフ表記である。該写真は、アデニン欠如最小限培地－寒天プレートの断面を示し、その上に該Vpu発現プラスミドpPLVpuを含有するXL-1－ブルーE. coli細胞のローンが蒔かれていr。番号6～11は、3μ滴下で塗布され、該寒天に浸された、試験されている種々の薬物の塗布のサイトに位置している。次いで、プレートを撮影前に37℃にて48時間イン

キュベートした。背景の灰色の影は細菌増殖のない領域に対応する。「10」周りの明るい円形領域はその場所へのアデニン塗布（正の対象）の結果による細菌細胞増殖を表している。「9」周りの細菌増殖の小さい方のハローは、その場所への5-（N,N-ヘキサメチレン）-アミロライドの塗布のためである。

【図6】 図6は、平面脂質二重層における5-（N,N-ヘキサメチレン）-アミロライドによるVpuイオンチャネル加勢の阻害をグラフ表記である。3つの軌跡は、必要な濃度のHMAの存在下で観察された典型的なVpuチャネル活性を表す。実線はゼロ電流レベルを示す。少なくとも30秒間の持続時間の連続チャネル記録から算出した平均電流（±偏差）は、3つの薬物濃度のそれぞれにつきグラフにプロットされる。

【図7a-b】 図7は、単球および単球由来マクロファージにおけるHIVビリオン産生に対するHMAの効果のグラフ表記である。培養上清中のHIVは、感染後様々な日に、定量ELISA法を用いてp24抗原の検出によりアッセイした。黒塗りのバーは10 μM HMAに暴露されたHIV感染細胞を表す。斜線のバーは、薬物に暴露されない対照細胞を表す。

【図8】 図8は、アミロライド、HMAおよびDMAの化学式の概略表記である： $R=H_2N$ 、アミロライド； $R=(CH_3)_2N$ 、DMA； $R=(CH_2)_6N$ 、HMA。

【図1a】

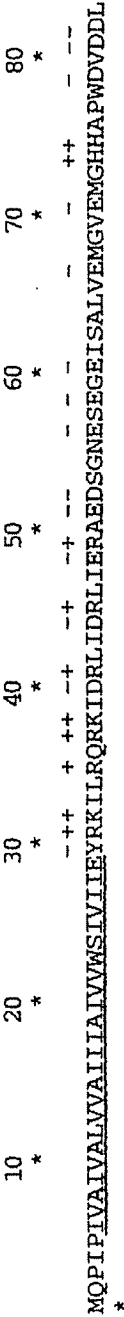


Figure 1a

【図1b】

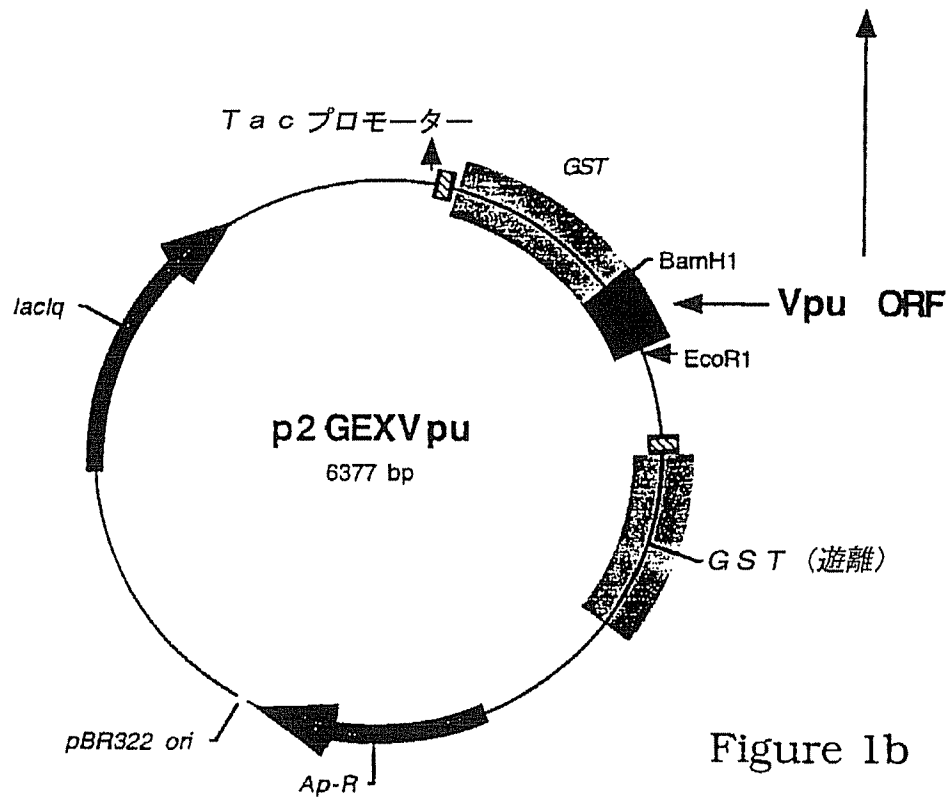


Figure 1b

【図1c】

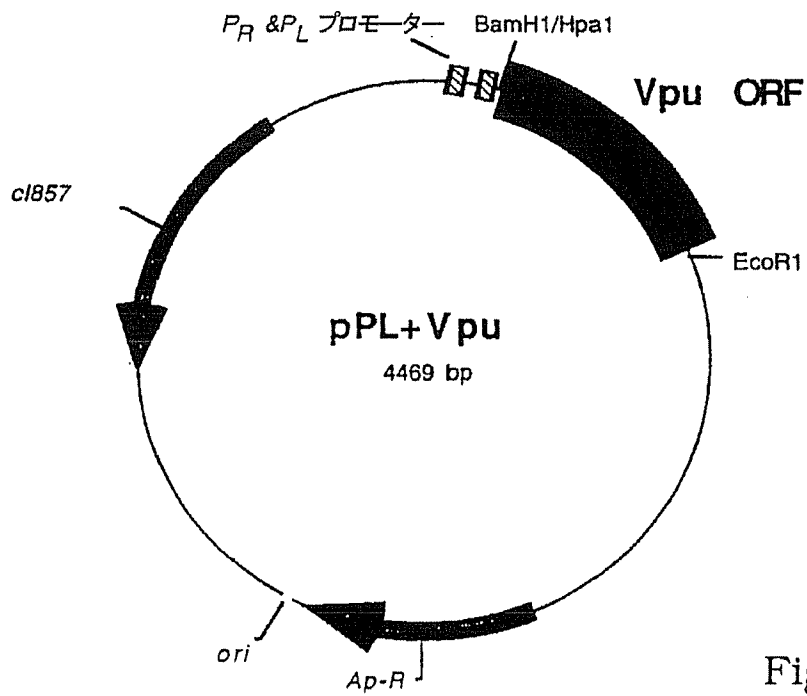


Figure 1c

【図2a】

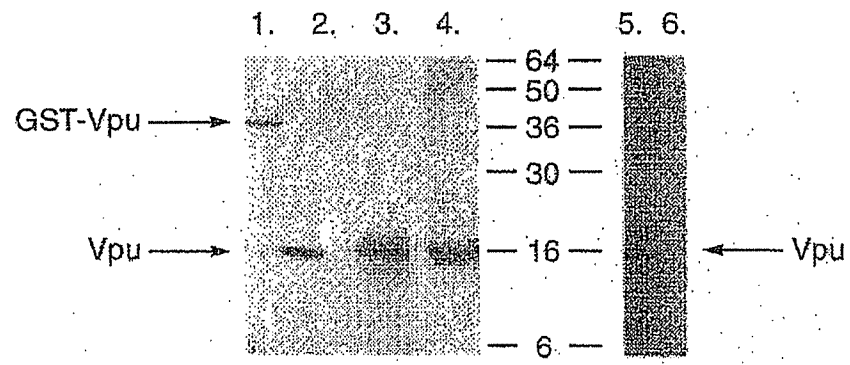


Figure 2a

【図2b】

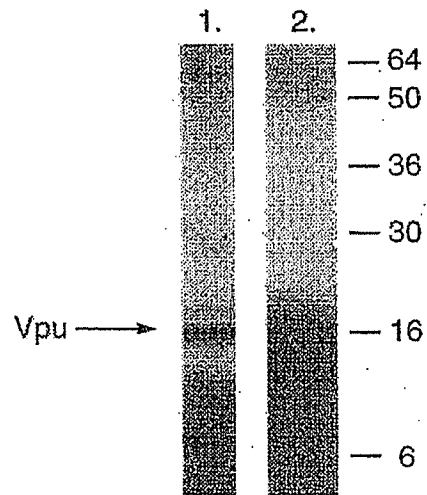


Figure 2b

【図3a】

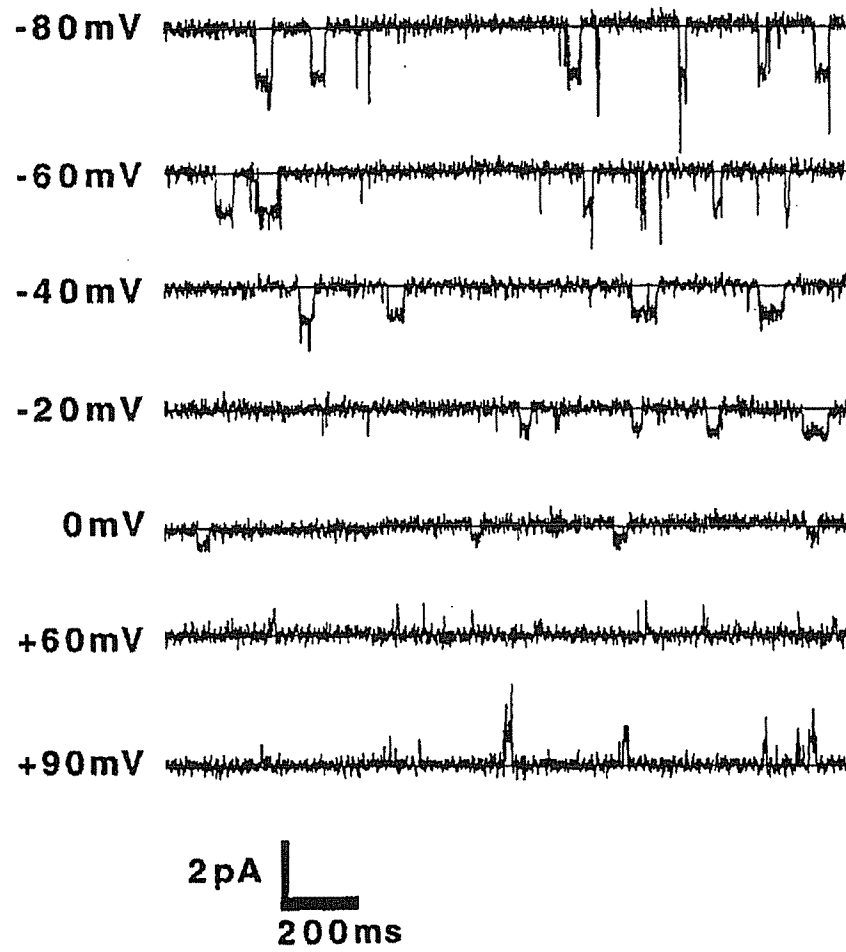


Figure 3a

【図3b】

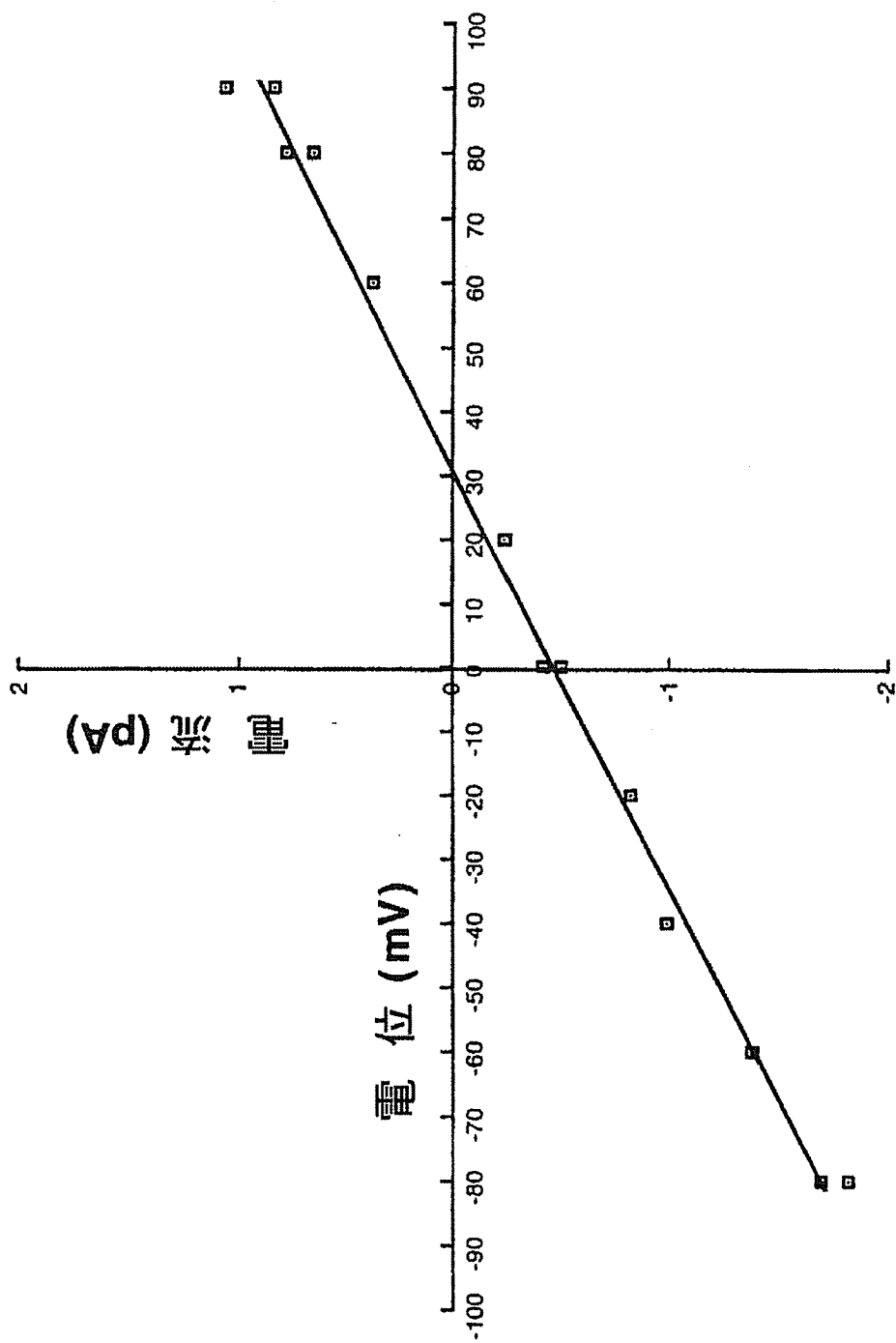
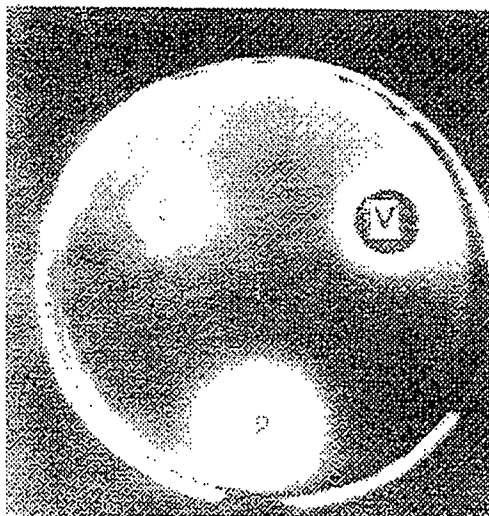


Figure 3b

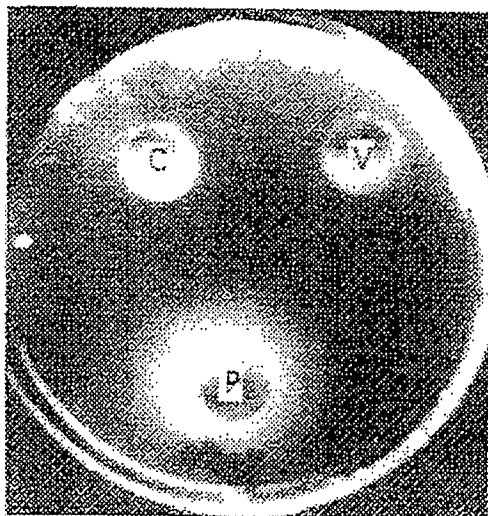
【図4a】

Figure 4a

37°C, Pro⁻ プレート

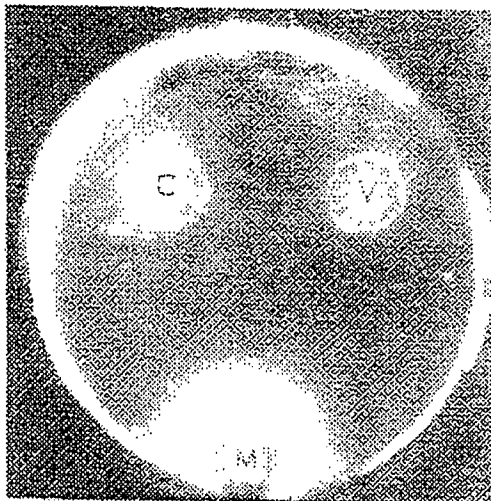
【図4b】

Figure 4b

30°C, Pro⁻ プレート

【図4c】

Figure 4c

37°C, Met⁻ プレート

【図5】

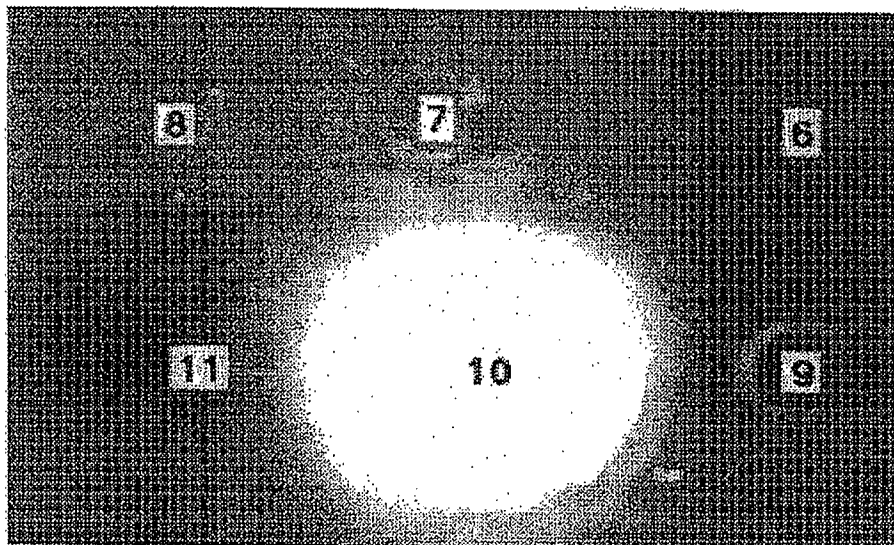


Figure 5

【図6】

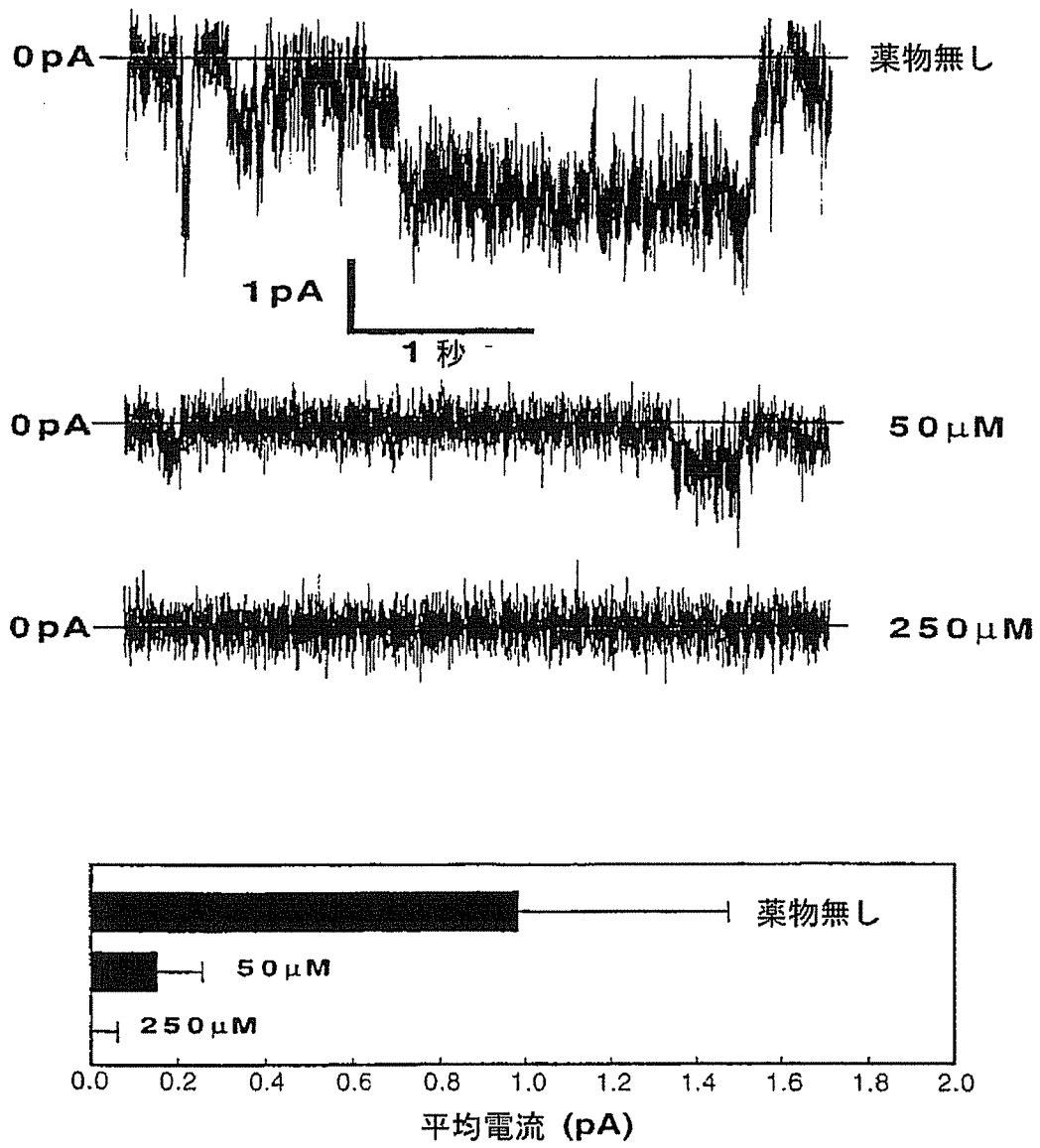
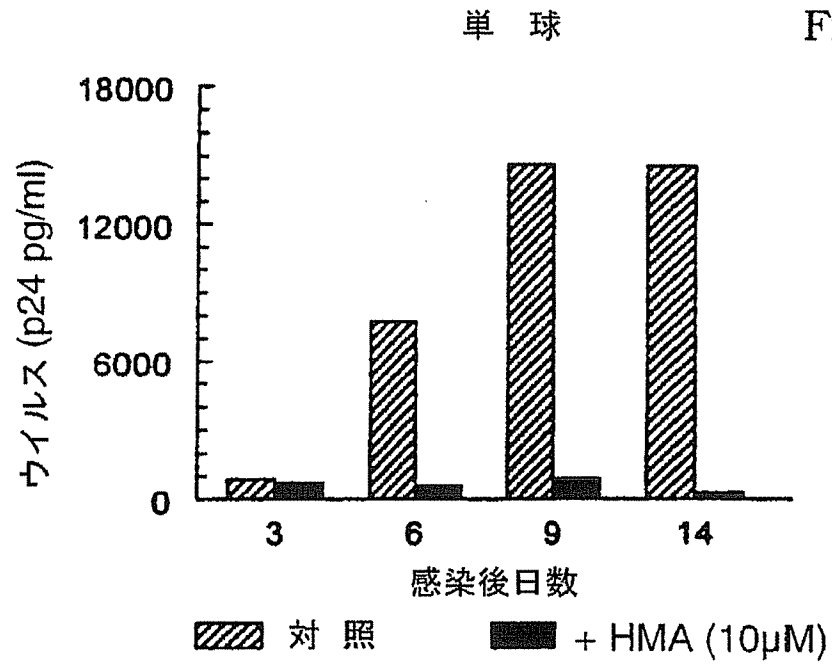
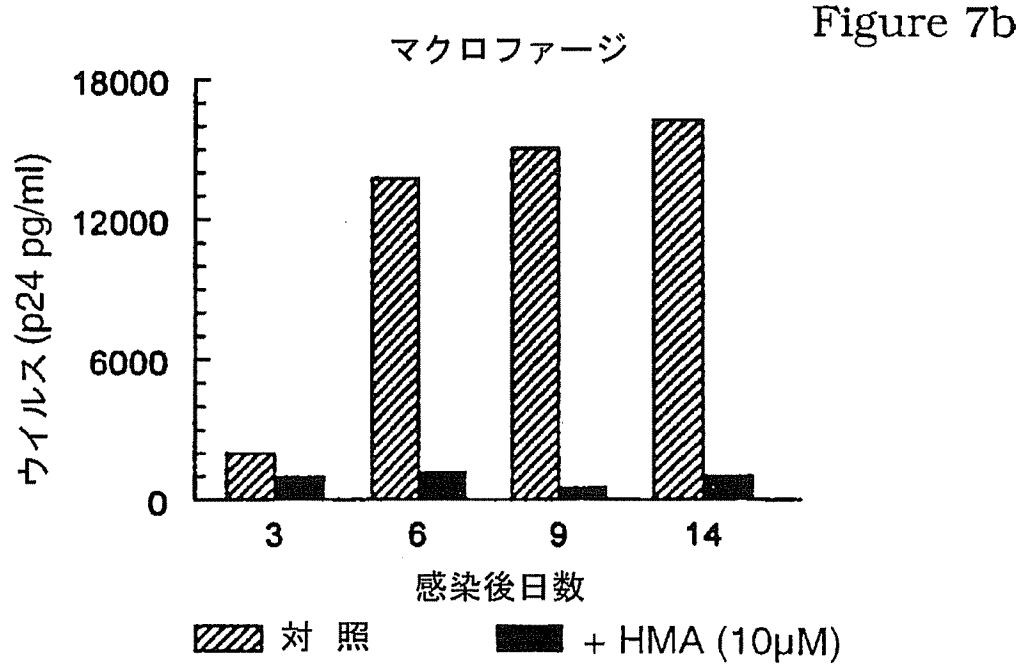


Figure 6

【図7a】



【図7b】



【図8】

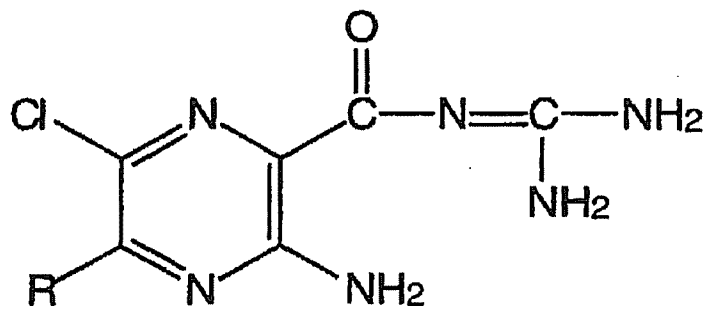


Figure 8

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No. PCT/AU 99/00872
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int Cl ⁶ : A61K 31/495		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC A61K 31/495, C07D 241/32.		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched AU :IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Chemical Abstracts : Amiloride analog structures and (HIV or AIDS or HTLV or Vpu) WPAT @A61K and amiloride)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Benos, Dale J et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol 91 pp 494-498, January 1994 "Envelope glycoprotein gp120 of human immunodeficiency virus type 1 alters ion transport in astrocytes: Implications for AIDS dementia complex."	
A	Schlanger, Lynn E. et al Kidney International Vol 45, (1994) pp 1070-1076 "K+-sparing diuretic actions of trimethoprim: Inhibition of Na+ channels in A6 distal nephron cells."	
A	Bubien, James K. et al Am J. Physiol. (1995), 286 (6, pt 1) C1440-C1449 1995. "HIV-gp 120 activates large-conductance apamin-sensitive potassium channels in rat astrocytes."	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 December 1999		Date of mailing of the international search report 17 DEC 1999
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer K. G. England Telephone No.: (02) 6283 2292

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No. PCT/AU 99/00872
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Makutonina, Alla et al Journal of Virology, Oct 1996, pp 7049-7055 Vol 70 No 10 "Human Immunodeficiency Virus Infection of T-Lymphoblastoid Cells Reduces Intracellular pH"	
A	Perazella, M.A. et al Clinical Nephrology Vol 476 No 3 - 1996 pp 187-192 "Trimethoprim-sulfamethoxazole hyperkalemia is an important complication regardless of dose."	

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ピーター・ゲイジ

オーストラリア2620ニュー・サウス・ウェールズ州クウィーンベヤン、パウエル・ドライブ130番

Fターム(参考) 4C084 AA17 MA01 NA01 NA14 ZB212
ZB331 ZB332 ZC551 ZC552
4C086 AA01 AA02 BC48 MA01 MA04
NA01 NA14 ZB21 ZB33 ZC55